

腸内細菌叢の変化に伴う  
炎症応答への影響に関する研究

酪農学園大学大学院  
獣医学研究科  
獣医学専攻博士課程

岸田 滋史

獣医ウイルス学ユニット  
指導教員 教授 萩原 克郎

2017 年度

## 目次

|          |  |
|----------|--|
| 緒言       | 1 頁  |
| 第 1 章    | 抗生剤投与による腸内細菌叢の構成変化と免疫応答の変化                   |
| 1. 序文    | 5  |
| 2. 材料・方法 | 7  |
| 3. 結果    | 11   |
| 4. 考察    | 20   |
| 5. 小括    | 22   |
| 第 2 章    | マウスにおける <i>Lactobacillus</i> 菌株投与による免疫機能への影響 |
| 1. 序文    | 23   |
| 2. 材料・方法 | 25   |
| 3. 結果    | 28   |
| 4. 考察    | 35   |
| 5. 小括    | 37   |
| 第 3 章    | 腸内細菌叢の構成変化と炎症応答への影響                          |
| 1. 序文    | 38   |
| 2. 材料・方法 | 40   |
| 3. 結果    | 43   |
| 4. 考察    | 51   |
| 5. 小括    | 54   |
| 総括       | 55   |
| 謝辞       | 57   |
| 参考文献     | 58   |

## 緒言

微生物は、地球上のバイオマスの約 80%を占めるとされ[3]、どのような環境に対しても、物理的に到達可能なほとんどの環境に生息する。ヒト、動物のからだに対しても同様である。外部環境と接する皮膚や粘膜面には、膨大な数の細菌が共生しており、これらは常在細菌叢と称す[38]。特に、大腸内腔は、細菌にとって最適な環境を提供しており、多数の細菌が棲息しているとされる。細菌群は、体表や腸管内で増殖し、さまざまな代謝物を恒常的に産生・分泌している。そのため、常在細菌叢は、宿主の生理・病理と密接に関係する。ヒトにおいて、常在細菌叢の部位別の総数は、皮膚 1 兆個、口腔 100 億個、胃 1 万個、小腸 1 兆個、大腸 1000 兆個となっており、特に腸内細菌の細菌叢が占める割合が大きく、宿主の健康に大きな影響を与えている[47]。

従来、腸内細菌叢の研究は、培養法による菌の生物学的・生化学的性状を詳細に調べる方法が主流であった。しかし、この方法では、培養が困難な嫌気性菌や少数菌の解析は難しかった。近年、次世代シーケンサーの登場により、常在細菌叢から直接ゲノム DNA を抽出し、配列を決定する「メタゲノム解析」が可能になり[48]、優勢菌種のみではなく、難培養菌や少数比率の菌の存在情報も得られるようになった。このメタゲノム解析の確立により、腸内細菌叢の研究では多くの知見が報告され、医療分野を始め様々な分野で関心が高まっている。

メタゲノム解析により、ヒト腸内の常在菌叢は、Firmicutes と Bacteroidetes の 2 つの門が最優勢を占め、Actinobacteria、Proteobacteria を含めて腸内細菌叢が構成されている。それらは、1 人あたり数百の菌種から構成され、その菌種構成は個人ごとに異なる[11]。腸内細菌叢の構成は年齢、居住地、食習慣、

地域環境、動物種により変動する[5, 39, 75]。De Fillipo らは、食事などの生活習慣と生活環境の公衆衛生等が大きく異なるアフリカとヨーロッパにおける子供の腸内細菌叢の構成を比較し、ヨーロッパの子供たちは、Firmicutes が優勢で、Bacteroidetes に属する菌は全体の 30%を占めるにとどまっていたが、アフリカの子供は、Bacteroidetes が全体の 70%以上を占めており、両者に顕著な違いが観察されることを報告した[13]。これら腸内細菌叢の構成の違いはその他にも報告されており、地域や民族の違い、食事や摂取カロリーの違いによるものだと考えられているが、腸内細菌叢の構成変化に貢献する因子の特定には至っていない[70]。

腸内細菌叢は、免疫細胞の活性化や分化誘導を促し腸管免疫に重要な役割を担っていることが明らかとなっている[6, 19, 28]。また、腸内細菌叢と炎症疾患やアレルギー疾患に関する疫学調査から、腸内細菌叢の構成がそれら疾患の発症率と関与していることが報告されている[9, 22, 31, 77]。その例として、乳児期の抗生剤処置による腸内細菌叢の変動とそれに伴う免疫疾患との関連性が指摘されている[65]。上記と類似した報告として、ヒトの幼児期における抗生剤処置によりアレルギー疾患の発症率増加が報告されている[74]。また、Mutius らは、アレルギー疾患の発症のリスクファクターは、2 歳までの抗生剤の経口投与歴と関係すると報告している[43]。このように、乳児期の腸内細菌叢は、生後から離乳後まで大きな変化を示し、幼児期に成人の構成叢になることから[39]、その時期の薬剤による菌叢変化は免疫応答系に影響する可能性が指摘される[66]。この点については、動物実験で検証されている。Imani らは、生後から無菌維持で成長したマウスはヘルパーT 細胞 2 型(Th2) 応答が優位であり、正常な腸内細菌叢をもつ健常マウスに比べ、食物アレルギー症状が悪化すると報告している[25]。さらに、離乳直後のマウスに抗生剤を経口投与して、

一過性に腸内細菌を除去すると、成長した後も Th2 反応が優位な免疫反応が続くことが明らかとなっている[25]。以上の研究から、若齢期の抗生剤投与が腸内細菌叢の構成を変化させ、その変化に伴い Th2 系の反応やアレルギー疾患リスクを増加させる可能性が推察されるが、詳細な免疫応答に関する機序は明らかになっていない。

腸内細菌叢の構成の乱れや免疫機能の改善を目的に、プロバイオティクスが用いられる。プロバイオティクスとは、腸内細菌のバランスを改善することにより宿主に保健効果を示す生きた微生物と定義されている[16]。プロバイオティクスは、正常な腸内常在菌の維持と調節により腸内環境改善(整腸)作用を有する。プロバイオティクスの整腸作用は、便秘や下痢の改善以外には、アレルギー疾患の症状の軽減作用も報告されている[30, 44]。プロバイオティクスには、乳酸菌、酪酸菌、および納豆菌などが含まれ、特に、*Lactobacillus* や *Bifidobacterium* に代表される乳酸菌は、樹状細胞に取り込まれ、サイトカイン産生を促進することで腸管の免疫応答に関与することが明らかとなっている[23, 34]。乳酸菌の中でも、*Lactobacillus* は、ヒトの腸内に常在する菌種であり、プロバイオティクス製品としても使用されている。*Lactobacillus* のプロバイオティクスとしての機能として、免疫賦活化作用や炎症抑制機能の報告があり[44, 49]、腸内の *Lactobacillus* の炎症病態への関連が示唆されるが、詳しい機能は明らかになっていない。

以上のように、腸内細菌叢の構成が、免疫応答に関与することが報告されている。しかし、腸内細菌叢の構成変化が、全身もしくは腸管の免疫応答に対してどのような役割を果たしているか、その詳細なメカニズムはまだ解明されていない。本論文では、腸内細菌叢を改変したマウスモデルを用いて、腸内細菌叢の変化と宿主の免疫応答への影響を明らかにし、その関係性について検討する

ことを目的とした。

第 1 章では、若齢マウス (6 週齢) に複合抗生剤処置し腸内細菌叢を改変させ、それらマウスの腸内細菌叢のメタゲノム解析と免疫応答性の変化について検証した。

第 2 章では、プロバイオティクスとしての *Lactobacillus* 菌株の免疫賦活化作用に着目し、抗生剤処置により腸内細菌叢の構成が変化したマウスに対して、3 菌種の *Lactobacillus* を投与し腸内細菌叢および免疫機能の変化を検討した。

第 3 章では、卵白アルブミン (OVA) 誘導性肺炎症が腸内細菌叢構成の違いで病態がどのように変化するのか比較解析し、*Lactobacillus* 投与によるその炎症病態の変化を検討した。

## 第1章 抗生物質投与による腸内細菌叢の構成変化と免疫応答の変化

### 1. 序文

ヒトや動物の腸管内には、多種多様な細菌が存在し、複雑な腸内細菌叢が形成されている。この腸内細菌叢は、代謝、免疫系の成熟、病原菌の増殖抑制など様々な生理活性を担っており、腸内細菌叢と宿主の健康との関係性の解明が注目されている[27, 36, 54]。

従来、腸内細菌叢の解析法は、菌を培養し、その生物学的・生化学的性状を調べるのが主流であったが、この方法では、培養が困難な菌や菌叢中に占める割合が少ない菌は、解析が難しかった。近年、16S rRNA 遺伝子を標的とした分子生物学的手法の解析が行われるようになり[48]、次世代シーケンサーの開発と応用に伴い、腸内細菌叢のメタゲノム解析により網羅的な細菌構成を把握することが可能になった。

メタゲノム解析の知見から腸内細菌叢の構成は、年齢、居住地、民族、食習慣、地域環境により変動することが報告されている[5, 13, 75]。ヒトの腸内細菌叢の構成は、Firmicutes と Bacteroidetes の2つの門が最優勢を占め、その構成比は個人ごとに異なることが明らかになっているが、健常人では Firmicutes が優勢となっている[11]。炎症性腸疾患や食物アレルギーの罹患者においては、Firmicutes の減少と Bacteroidetes の増加により構成比が逆転することが報告されている[31, 77]。また、腸内細菌叢の多様性の低下は炎症性疾患と関与しており、Firmicutes の多様性の低下が炎症性疾患を悪化させることが明らかになっている[9, 22]。このように、腸内細菌叢の構成、特に Firmicutes と Bacteroidetes の構成比やその多様性の変化は、炎症疾患やアレ

アレルギー疾患との関与が示唆されている。

腸内細菌叢の構成を変化させる要因の一つに、抗生剤投与がある。抗生剤処置に伴う腸内細菌叢の変化は、喘息や食物アレルギーなどのアレルギー疾患やインフルエンザウイルス感染症の症状悪化を誘発することが指摘されている[24, 65]。若齢期からの抗生剤処置は、アレルギー疾患と関与する報告がある[74]。以上のように腸内細菌叢の構成変化とアレルギー疾患や炎症性疾患との関与が報告されているが、免疫細胞の割合の変化やそれらの応答性についての詳細は不明な点が多い。そこで、第 1 章では、若齢期における抗生剤処置によりもたらされる腸内細菌叢の変化および、その変化が免疫機能に及ぼす影響についてマウスモデルを用いて調べた。



## 2. 材料・方法

### 抗生剤投与マウスモデル作成

健康な BALB/c マウス (6 週齢) を使用した。マウスは、滅菌ケージ、滅菌床敷き、滅菌水道水と滅菌飼料で管理した。抗生剤 (ABT) 処置は、腸内細菌叢の多様な菌に広く作用して構成を変化させるために、グラム陽性菌や陰性菌に広い抗菌スペクトルをもつ 3 種 (ペニシリン (1000 単位/ml、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本)、カナマイシン (1 mg/ml、Meiji Seika ファルマ株式会社)、ストレプトマイシン (1 mg/ml、Meiji Seika ファルマ株式会社)) を複合して飲水投与した [32, 67, 71]。抗生剤投与したマウス群 (以下、ABT 群) は、複合抗生剤を 1 週間、自由飲水にて投与した後、滅菌水道水と滅菌飼料で飼育した。対照マウス群 (以下、CN 群) は、滅菌水道水と滅菌飼料を実験期間中与えた。抗生剤投与から 2 週間 (8 週齢時) に直腸便、腸間膜リンパ節 (MLN)、パイエル板 (PP)、および脾臓の採材を行った。本研究は、酪農学園大学実験動物委員会における動物倫理審査の承認 (VH14A3) を受け遂行した。

### 腸内細菌の培養法による生菌数解析

マウスより採材した直腸便は直ちに、希釈液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (キシダ化学株式会社、大阪、日本) 0.45 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (関東化学株式会社、東京、日本) 1.68 g、L-システイン  $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (キシダ化学株式会社) 0.05 g、Tween80 (キシダ化学株式会社) 0.05 g、寒天 (伊那食品工業株式会社、長野、日本) 0.1 g を蒸留水 1 L に溶解し、 $121^\circ\text{C}$  15 分で滅菌処理したもの) を用いて、直腸便を 10 倍段階希釈により、 $10^1$  から  $10^7$  に希釈した。直腸便希釈溶液は、変法 LBS 寒天培地 (日水製薬株式会社、東京、日本)、BS 寒天培地 (日水製薬株式会社)、DHL 寒天培地 (日水製

薬株式会社)、GAM 寒天培地(日水製薬株式会社)に 50  $\mu$ l ずつ塗布した。DHL 培地は好気条件下で 24 時間、変法 LBS 寒天培地、BS 寒天培地、GAM 寒天培地は嫌気環境下で 48 時間、それぞれ 37°C で培養を行った。培養終了後、各寒天培地のコロニー数を計測し、糞便 1 g 当たりの Colony forming unit (CFU) を算出した。本研究で使用した選択培地で測定できる菌種は、変法 LBS 寒天培地は *Lactobacillus* 属菌、BS 寒天培地は *Bifidobacterium* 属菌、DHL 寒天培地は大腸菌群、GAM 寒天培地は総嫌気性菌である。

#### 腸内細菌叢のメタゲノム解析

各マウスより採材後-80°C 保存した直腸便から、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。その後、16S rRNA の V1-V2 領域をプライマー(27Fmod: 5' -AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' and 338R: 5' -TGC TGC CTC CCG TAG GAG T-3' )を用いて増幅した。メタゲノム解析は、318 chip and Ion PGM Sequencing 400 kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて Ion PGM sequencer を使用した。得られたデータは、the QIIME pipeline より解析を行った[14]。

#### フローサイトメトリー

各マウス群から採取した脾臓をナイロンメッシュにより濾過し、塩化アンモニウム(0.8%)で溶血後、PBS 洗浄し単核球細胞を得た。この脾細胞は、リンパ球サブセット解析に用いられた。検出には、抗マウス CD3-FITC 抗体(Beckman coulter, Brea, CA, USA)、抗マウス CD19-PE 抗体 (Beckman coulter)、抗マウス CD4-FITC 抗体(Beckman coulter)、抗 CD8a/Lyt-2-PE 抗体(Beckman coulter)を用いた。

## サイトカイン遺伝子発現

各マウス群から採取した MLN、PP ならびに脾臓からナイロンメッシュにて濾過し塩化アンモニウム (0.8%) で溶血して PBS で洗浄して単核球細胞を得た。T 細胞の刺激応答を解析するために、脾細胞をコンカナバリン A (Con A) ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) で 5 時間刺激した。回収した MLN、PP、ならびに Con A 刺激した脾細胞から、RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で RNA を抽出した。得られた RNA から、First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland) を用い、oligo d(T) プライマーにて cDNA を合成した。各サイトカイン (インターフェロン (IFN)- $\gamma$ , インターロイキン (IL)-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, トランスフォーミング増殖遺伝子 (TGF)- $\beta$ , ならびに内在性コントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) の mRNA の発現を、QuantiTect SYBR Green kit (QIAGEN) を用いて Light cycler (Roche) で解析した。得られたデータは、GAPDH 遺伝子発現より標準化した。サイトカイン遺伝子発現を測定するために用いた PCR プライマーは、IFN- $\gamma$ , sense 5' -TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAA-3', antisense 5' -GTTGTTGCTGATGGCCTGAT-3' : IL-6, sense 5' -CAGAGGATACCACTCCCAACA-3', antisense 5' -TGAATTGCCATTGCACAAC: IL-13, sense 5' -CCAGGGCTACACAGAAGTGC-3' : TGF- $\beta$ , sense 5' -AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3', antisense 5' -CAATTCCTGGCGTTACCTTG-3' and GAPDH, sense 5' -CGTGAGTGGAGTCATACTGAT-3', antisense 5' -AACGGATTGGCCGTATTG-3' である。IL-4, IL-10, IL-12, および IL-17 遺伝子発現は、QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) を用いて測定した。

## 統計処理

統計上の有意差検定は、CN 群と ABT 群の両群間で、Student' s t-test で行い、 $p$  値が 0.05 未満の場合は有意差があると判定した。腸内細菌叢の主成分分析は、統計ソフトウェア R version 3.4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)を用いた。

### 3. 結果

#### 腸内細菌叢の解析

抗生剤処置による腸内細菌叢各菌種の変化を培養法により比較した結果を図 1 に示す。

総嫌気性菌(総生菌数)は、CN 群は  $9.3 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ 、ABT 群は  $9.1 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$  となり、群間に有意な差はなかった。*Lactobacillus* 属菌は、CN 群は  $9.2 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$  検出されたのに対し、ABT 群は LBS 寒天培地では検出されなかった。*Bifidobacterium* 属菌は CN 群が  $7.9 \pm 0.4 \log \text{CFU/g}$ 、ABT 群が  $8.1 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、大腸菌群では、CN 群が  $4.5 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、ABT 群が  $4.8 \pm 0.5 \log \text{CFU/g}$  となり、両群間に有意差は認められなかった。

メタゲノム解析を実施したサンプルの 16S rRNA 遺伝子のリード数は、 $14,229 \pm 2,634$  であった。メタゲノム解析において門レベルで得られた結果を図 2 に示す。CN 群の Firmicutes は、Relative abundance (RA):  $58.1 \pm 14.4\%$  検出菌の中で優勢菌を示したが、ABT 群では、Firmicutes が RA:  $40.3 \pm 10.1\%$  と減少し、Bacteroidetes が RA:  $59.4 \pm 10.2\%$  と増加し優勢菌となった。Actinobacteria における、CN 群の RA 値は  $0.5 \pm 0.2\%$  を示したが、ABT 群では Actinobacteria が検出されなかった。Proteobacteria は、CN 群が RA:  $1.4 \pm 1.0\%$ 、ABT 群が RA:  $0.1 \pm 0.1\%$  となり、ABT 群の値は CN 群に比べ減少した。腸内細菌叢のメタゲノム解析結果による主成分分析した結果を図 3 に示した。クラスター解析において、CN 群と ABT 群はそれぞれ異なる分布でクラスターを形成した。科レベルにおいて検出されたすべての菌を表 1 に示した。CN 群は、19 種の菌が検出できたのに対し、ABT 群は 13 種と減少し、約 30% の検出菌数の減少がみられ、多様性が低下していた。培養法において、*Lactobacillus* 属菌は ABT 群から

検出されなかったが、メタゲノム解析においては、*Lactobacillaceae* が RA: 12.8 ± 3.3% 検出され、CN 群の RA: 15.3 ± 7.6% と比べ、ほぼ同比率であった。

#### 腸管付属リンパ組織のサイトカイン発現

腸内細菌叢の変化に伴う腸管免疫の影響を検討するために、腸管付属リンパ組織である腸間膜リンパ節 (MLN) とパイエル板 (PP) のサイトカイン遺伝子発現を各群で比較した。ABT 群と CN 群の遺伝子発現を比較した結果、測定した全てのサイトカイン発現が ABT 群で低下を示した。ABT 群で有意に低下したサイトカインは、MLN における TGF- $\beta$  と PP の IL-6 発現であった ( $p < 0.05$ 、図 4)。

#### 脾細胞のリンパ球サブセット

腸内細菌叢の構成の変化に伴う脾細胞のリンパ球サブセットを測定した結果を図 5 に示す。CD3 陽性細胞の変化では、ABT 群において約 13% の有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ )。その内 CD4 陽性細胞において、ABT 群は約 9% 減少し、CD8 陽性細胞は約 6% 減少し、CN 群と比較し有意に減少した ( $p < 0.05$ )。一方、CD19 細胞は、ABT 群で約 19% と有意に上昇することが示された ( $p < 0.01$ )。

#### 脾細胞の Con A に対するサイトカイン応答

ABT 処置により Con A 刺激に対する脾細胞のサイトカイン遺伝子発現を比較した結果を図 6 に示す。ABT 群のサイトカイン遺伝子発現は、CN 群と比較して低かった。ABT 群において有意な発現低下を示したサイトカインは IFN- $\gamma$ 、IL-6、ならびに IL-13 であり、CN 群の相対発現量を 1 とした場合、各 ABT 群の相対発現量は、IFN- $\gamma$  は 0.07、IL-6 は 0.16、IL-13 は 0.05 であった ( $p < 0.05$ 、図 6)。

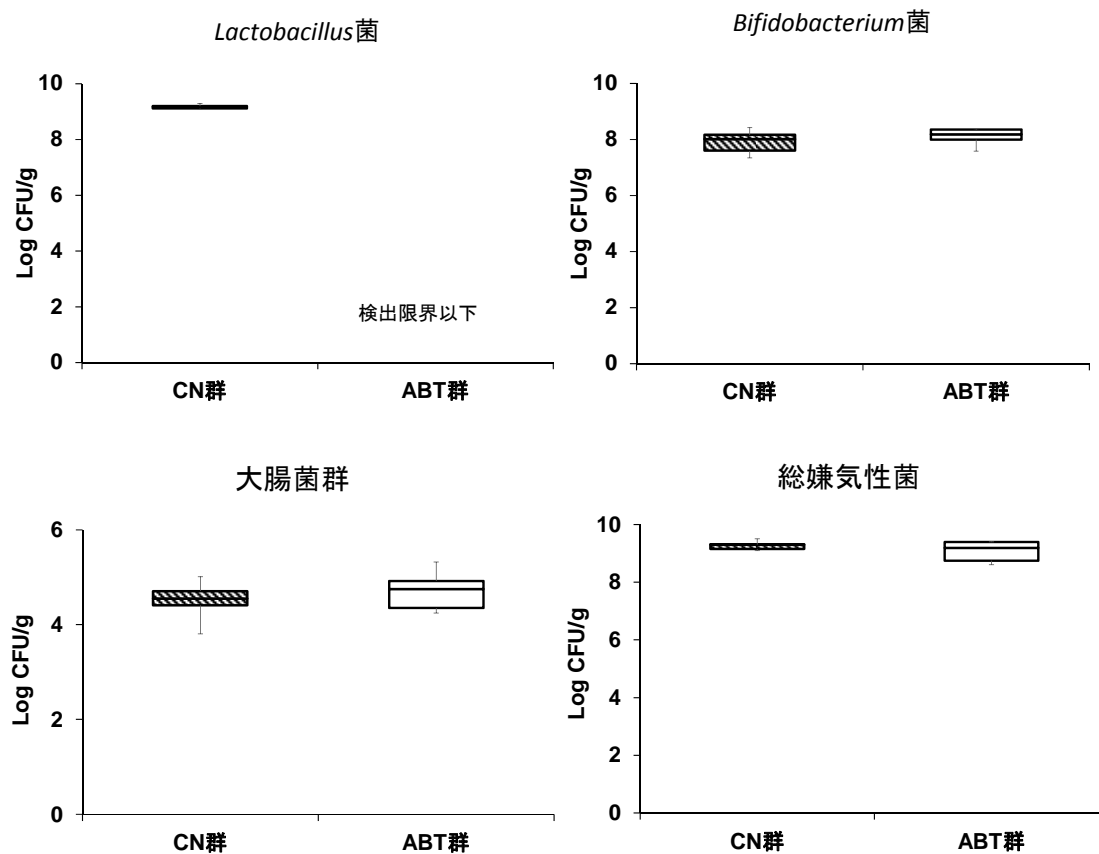


図 1. 抗生剤投与による腸内の生菌数

対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウスの直腸便中の生菌数を測定し、の *Lactobacillus* 菌数、*Bifidobacterium* 菌数、大腸菌群数、総菌数について示した。縦軸は、log CFU/g を示した (n=6)。

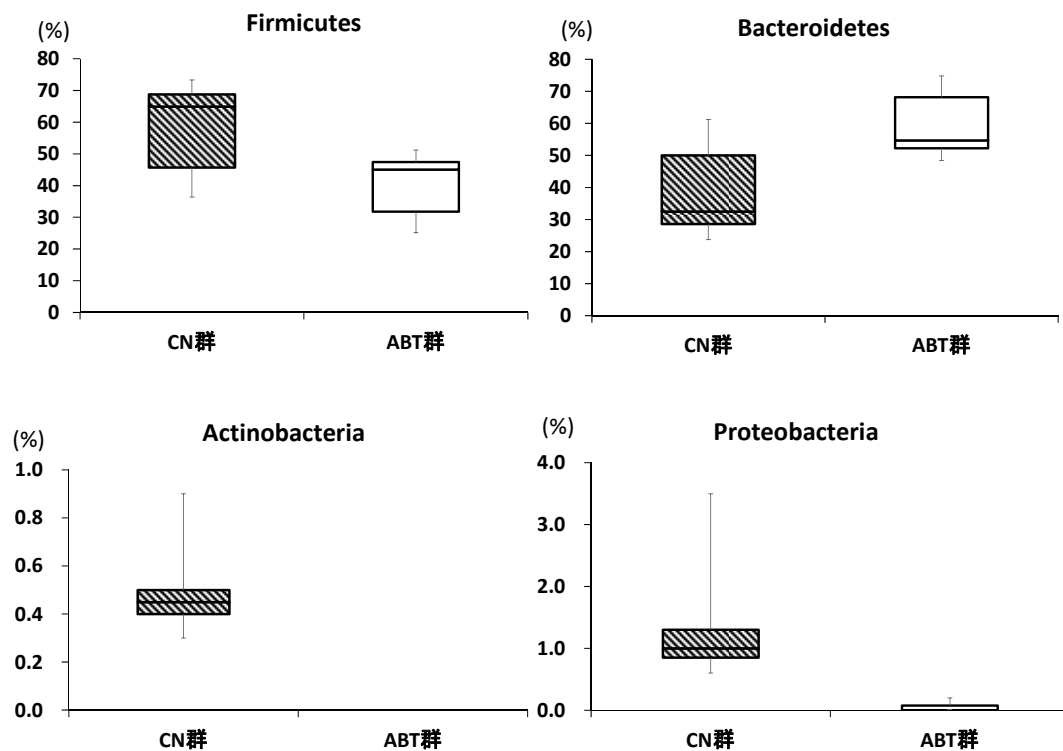


図 2. 抗生剤処置による腸内細菌叢変化（門レベル）

対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウスの腸内細菌叢をメタゲノム解析し門レベルの変化 (Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、ならびに Proteobacteria) を図に示した (n=6)。



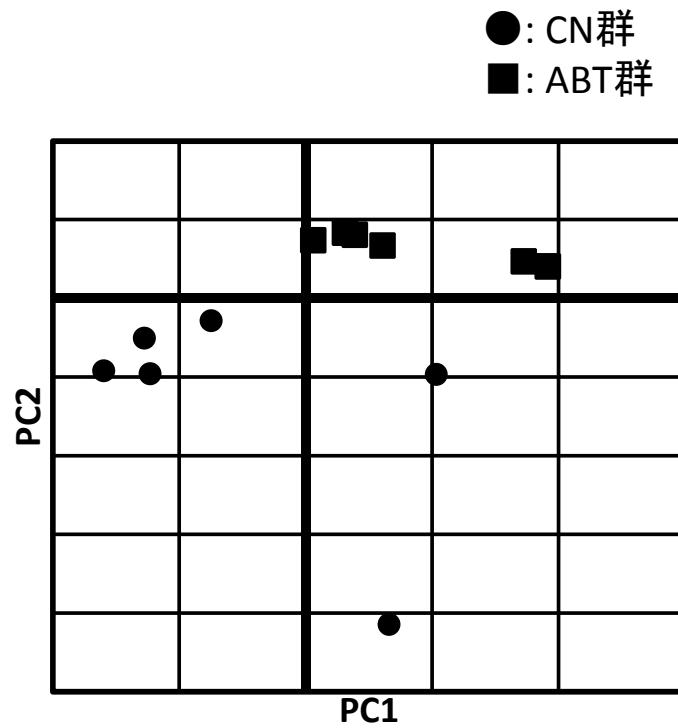


図 3. 腸内細菌叢における門レベルの主成分解析

対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウスの腸内細菌叢をメタゲノム解析し、門レベルの菌種を主成分分析を行い、各個体の結果を示した (n=6)。

表1. 抗生剤 (ABT) 処置による腸内細菌叢の変化

| 門              | 科                          | CN 群      |       | ABT 群     |      |
|----------------|----------------------------|-----------|-------|-----------|------|
|                |                            | 平均<br>(%) | SE    | 平均<br>(%) | SE   |
| Firmicutes     | <i>Lactobacillaceae</i>    | 15.30     | 7.56  | 12.80     | 3.26 |
|                | <i>Streptococcaceae</i>    | 0.82      | 0.61  | 0.00      | 0.00 |
|                | <i>Turicibacteraceae</i>   | 0.12      | 0.22  | 0.10      | 0.12 |
|                | <i>Clostridiales</i>       | 22.92     | 11.63 | 13.62     | 6.70 |
|                | <i>Clostridiaceae</i>      | 0.72      | 1.12  | 0.18      | 0.09 |
|                | <i>Dehalobacteriaceae</i>  | 0.05      | 0.05  | 0.07      | 0.07 |
|                | <i>Lachnospiraceae</i>     | 10.60     | 5.51  | 5.82      | 1.78 |
|                | <i>Ruminococcaceae</i>     | 5.60      | 2.26  | 6.90      | 4.51 |
|                | <i>Mogibacteriaceae</i>    | 0.30      | 0.06  | 0.10      | 0.08 |
|                | <i>Erysipelotrichaceae</i> | 1.20      | 0.85  | 0.37      | 0.20 |
| Bacteroidetes  | <i>Bacteroidaceae</i>      | 6.57      | 3.79  | 18.67     | 7.75 |
|                | <i>Prevotellaceae</i>      | 1.70      | 1.24  | 9.77      | 2.90 |
|                | <i>Rikenellaceae</i>       | 3.63      | 1.42  | 4.92      | 3.24 |
|                | <i>Bacteroidales S24-7</i> | 26.82     | 9.24  | 26.00     | 6.64 |
|                | <i>Odoribacteraceae</i>    | 0.10      | 0.06  | 0.00      | 0.00 |
| Proteobacteria | <i>Alcaligenaceae</i>      | 0.33      | 0.20  | 0.00      | 0.00 |
|                | <i>Desulfovibrionaceae</i> | 0.62      | 0.35  | 0.00      | 0.00 |
|                | <i>Enterobacteriaceae</i>  | 0.45      | 1.01  | 0.00      | 0.00 |
| Actinobacteria | <i>Coriobacteriaceae</i>   | 0.48      | 0.19  | 0.00      | 0.00 |

メタゲノム解析を用いて、対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウスの腸内細菌叢の科レベルで同定された菌の相対比の平均と標準誤差 (SE) を示した (n=6)。

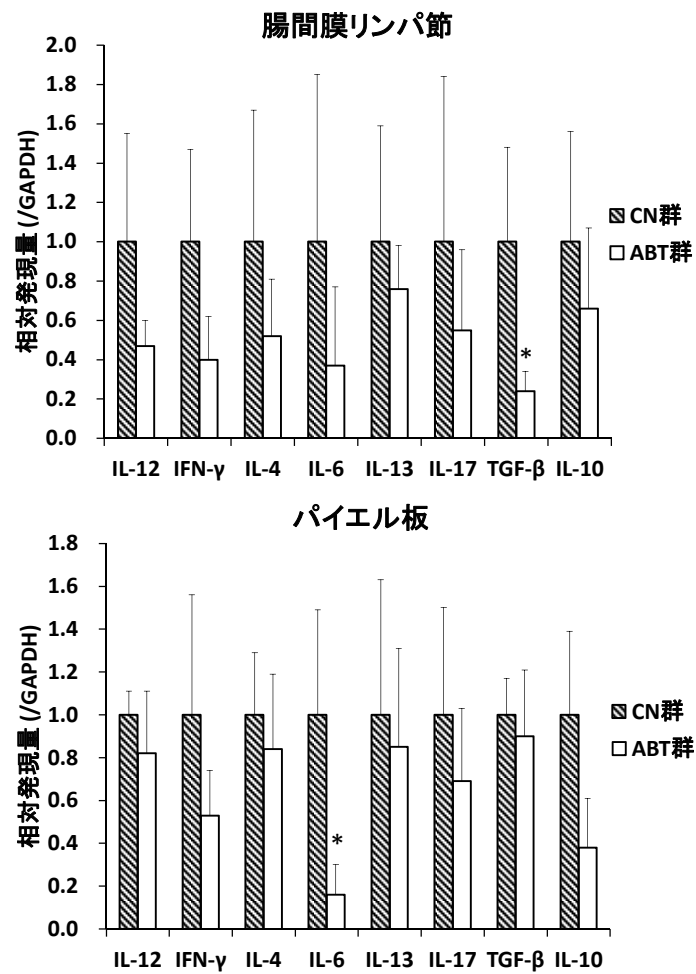


図 4. 腸管リンパ器官(腸間膜リンパ節(MLN)、パイエル板(PP))のサイトカイン遺伝子発現

対照(CN)群、抗生剤処置(ABT)群の各群マウスの MLN と PP のサイトカイン遺伝子発現を、GAPDH の発現で標準化し、CN 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$

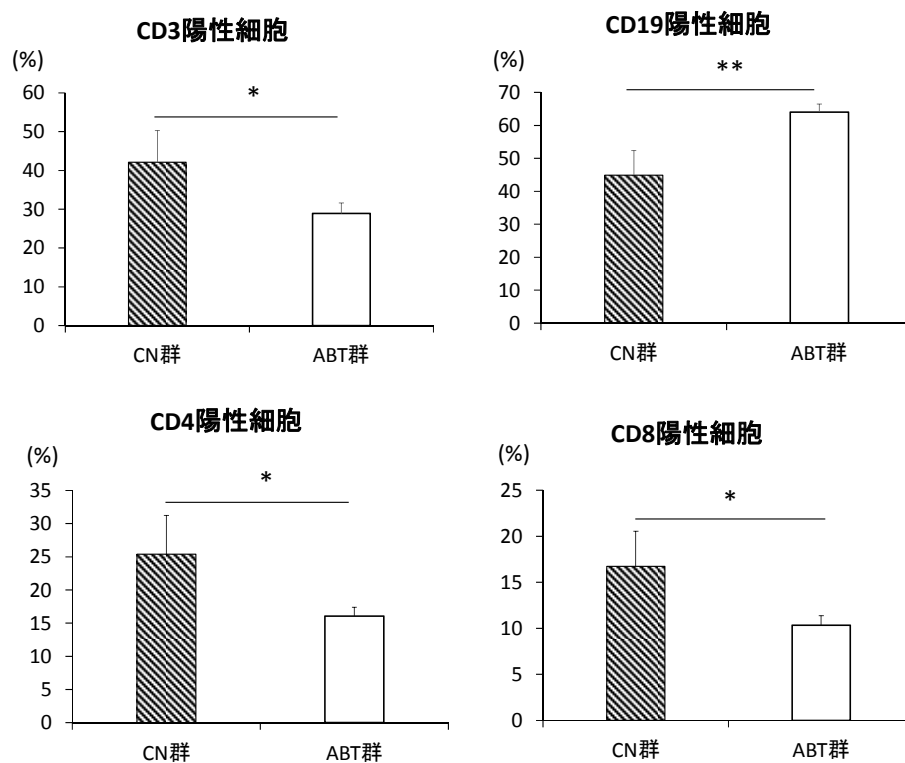


図 5. 脾細胞のリンパ球サブセット解析

対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウスの脾細胞中のリンパ球サブセット (CD3、CD19、CD4 および CD8 陽性細胞率) を示した。縦軸には、リンパ球中における各細胞の割合を示した。グラフは平均値と標準誤差を示した ( $n=4$ )。

\*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$

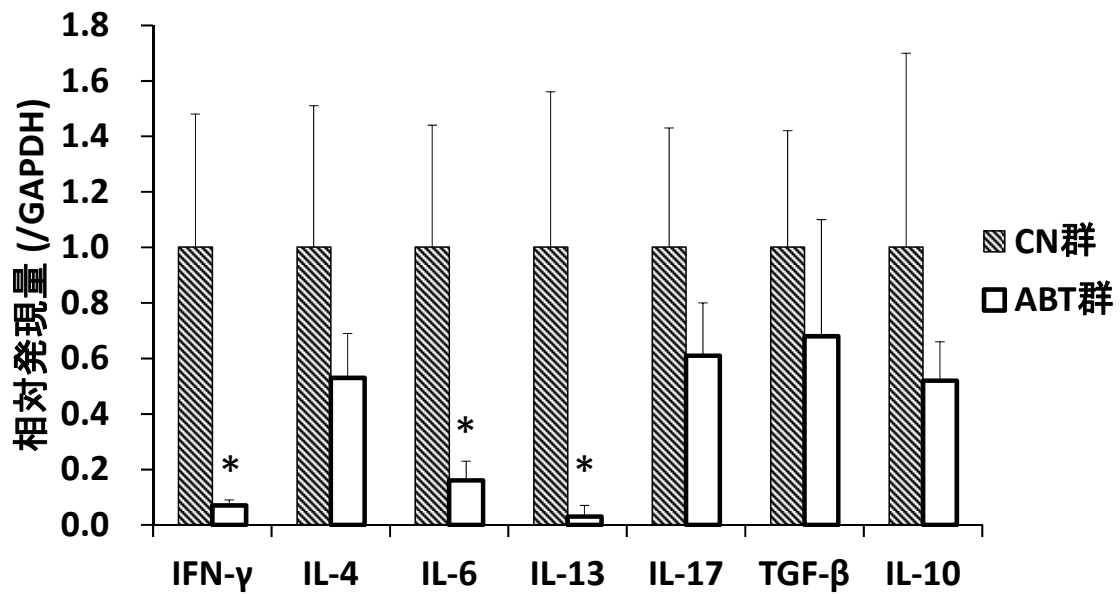


図 6. コンカナバリン (Con A) 刺激した各群由来脾細胞のサイトカイン発現  
 対照 (CN) 群、抗生剤処置 (ABT) 群の各群マウス由来の脾細胞を Con A ( $3 \mu\text{g/mL}$ )  
 で 5 時間刺激した。刺激細胞のサイトカイン遺伝子発現を GAPDH 遺伝子発現に  
 より標準化した。縦軸は、CN 群を 1 とした時の相対発現量を示した ( $n=4$ )。

\*  $p < 0.05$

#### 4. 考察

腸内細菌叢は、宿主の免疫機能と密接な関係が指摘されている[22, 45, 70]。本章は、ABT 処置が及ぼす免疫応答への影響を検討する目的で、ABT 処置により腸内細菌叢を改変させたマウスモデルを作成した。それらマウスの腸内細菌叢の構成を培養法とメタゲノム解析により調べた。ABT 処置したマウスは、培養法では総生菌数に変化を示さなかったが、マウスで優勢菌である *Lactobacillus* 属菌が検出されなかった。*Bifidobacterium* 属菌や大腸菌群は、ABT 処置による変化はなかった。以上から、培養法では *Lactobacillus* 選択培地で増殖する菌が消失することが明らかとなったが、培養できない菌叢の詳細な変化を確認することは困難であった。そこで、同一サンプルをメタゲノム解析した結果、優勢菌であった Firmicutes が、ABT 処置により有意に減少し、Bacteroidetes が優勢菌となることが明らかになった。主成分分析とクラスター分析では、各 ABT 群と CN 群は分かれており異なる菌叢構成であることが示された。科レベルの比較解析から、ABT 処置により Proteobacteria と Actinobacteria が検出されなくなり、検出された菌種数は全体で約 30%減少することが明らかとなり、構成菌の多様性が低下することが示唆された。これらの結果から、ABT 処置は、腸内総生菌数は変化させず、その菌構成比と多様性を低下させることが明らかとなった。また、培養法において、ABT 群において *Lactobacillus* 属菌の検出はなかったが、メタゲノム解析では、*Lactobacillus* が含まれる *Lactobacillaceae* が CN 群と同比率検出された。この結果は、ABT 処置により *Lactobacillus* 生菌数の減少がみられても、*Lactobacillaceae* の核酸レベルの菌数は減少しないことが示唆された。

腸内細菌叢の構成が、アレルギー疾患や炎症性疾患の罹患率に関与している

ことが報告されている[10, 52, 72]。そして、腸内細菌叢の多様性の低下も、アレルギー性の疾患発症と関与することが指摘されている[50, 68]。本章では、ABT 処置は、腸内細菌叢を変化させるとともに脾臓における CD3 陽性細胞の減少と CD19 陽性細胞の増加が認められた。これらの変化に類似した報告として、ABT 処置により小腸と大腸中の CD3 陽性細胞 (CD4、CD8 陽性細胞) を減少させることが報告されている[12]。また本章では、MLN や PP における IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6 ならびに IL-17 のサイトカイン遺伝子発現が ABT 処置により減少することを確認しており、これらの発現低下が CD3 陽性細胞の減少と関連する可能性が推察された。ABT 群の Con A 刺激に対する脾細胞応答では、CN 群と比べ、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、ならびに TGF- $\beta$  発現が減少し、特に IFN- $\gamma$ 、IL-6、ならびに IL-13 発現は有意に減少した。IFN- $\gamma$  は、Th1 型細胞から産生されるサイトカインであり、IL-6 と IL-13 は、ヘルパーT 細胞 2 型 (Th2) 細胞から産生されるサイトカインである。これらのサイトカイン発現の低下を示したことから、ABT 処置は Th1/Th2 応答バランスの不均衡を誘導する可能性が示唆された。以上の結果より、ABT 処置により誘導される腸内細菌叢の構成変化が個体の免疫応答に影響することが示唆された。

## 5. 小括

本章では、抗生剤 (ABT) 処置したマウスの腸内細菌叢の構成の変化と、その変化に伴うリンパ球への影響について解析した。本章の研究により以下の知見を得た。

マウスへの ABT 処置により、

- ① ABT 処置は、腸内総菌数は変化しないが *Lactobacillus* 選択培地で増殖する菌が消失した。また、メタゲノム解析により Firmicutes と Bacteroidetes 菌叢の構成比が逆転し Bacteroidetes が優勢菌となり、それら菌の多様性も低下した。
- ② ABT 群は、腸管付属リンパ組織の MLN と PP 由来リンパ球における IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 ならびに TGF- $\beta$  遺伝子発現を低下させた。
- ③ ABT 群は、脾細胞の CD3 陽性細胞を減少させる一方、CD19 陽性細胞の割合を増加させた。それら T 細胞の Con A 刺激応答では IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 ならびに TGF- $\beta$  遺伝子の発現が低下した。

以上の結果より若齢マウスに対する抗生剤投与は、腸内細菌叢の構成変化とその多様性の低下を誘導した。さらに、その抗生剤処置個体の脾細胞の CD3 陽性細胞と CD19 陽性細胞の割合と Con A に対するサイトカイン応答の低下を誘導することが明らかとなった。



## 第2章 マウスにおける *Lactobacillus* 菌株投与による免疫機能への影響

### 1. 序文

プロバイオティクスは、1989年に Fuller により“腸内常在菌のバランスを変えることにより宿主に保健効果を示す生きた微生物”と定義された[16]。その後“宿主に保健効果を示す生きた微生物を含む食品”として再定義された[60]。現在、プロバイオティクスとして使用されている微生物の多くは乳酸菌である。乳酸菌は、哺乳類の腸内細菌叢を構成する菌であり、生体の細菌叢バランスをコントロールし、個体の免疫応答を活性化する[39]。

近年の研究動向では、プロバイオティクスおよびその関連食品の安全性と機能評価は、主として菌株レベルで科学的に検証されている[7]。すなわち、乳酸菌のプロバイオティクス効果の一つ“免疫賦活化作用”は、菌種や菌株により異なることが報告されている[12, 17]。その生体作用は、菌株により多様であることが知られている。例えば、*L. casei* 菌のある株には、Th1 型の免疫応答に関連する IL-12 や IFN- $\gamma$  の産生を誘導するものが存在する[37]。*L. pentosus* の中には、IFN- $\gamma$  産生を誘導する株や IL-4 産生を誘導する株が各々存在し、株によりその作用が異なる[46]。

乳酸菌プロバイオティクスと疾病に関する報告では、アレルギー症状の軽減や発生率を低下させる報告がある[44, 61]。プロバイオティクスとして研究されている乳酸菌は、商業用発酵乳スターターなどの動物性食品由来の菌が主であったが、近年植物性食品由来の乳酸菌も注目されている。その中の代表株として、*Lactobacillus plantarum* が挙げられるが、*L. plantarum* は漬物など植物を用いた発酵食品から高頻度に分離され、日本人に身近な乳酸菌である。

その機能として、アレルギー性疾患に対し改善作用を有する報告がある[44, 49]。それらの乳酸菌は、*in vitro*での Th1 や Th17 細胞の免疫活性化誘導性を有することが報告されている[34]。

第1章では、抗生剤(ABT)処置が *Lactobacillus* 生菌数を減少させ、腸内細菌の優勢菌が Bacteroidetes に変化し、リンパ系細胞の免疫応答能に影響を及ぼす事を明らかにした。本章では、*Lactobacillus*に着目し、その ABT 処置マウスに3種の *Lactobacillus* 菌を投与しリンパ球系細胞の刺激応答性を比較した。

## 2. 材料・方法

### 使用乳酸菌

試験は、3 種の *Lactobacillus* 菌株を使用した。その一つは、本研究室保存菌株である *Lactobacillus plantarum* RGU Lp1 株（特許第 5610472 号）（以下、Lp1）を使用した。この菌株は発酵乳由来の乳酸菌であり IFN- $\gamma$  産生を誘導する菌株である。この対照として Lp1 株の同種の菌株である、標準菌株 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917T 株（以下、Lp14917）を使用した。また、当実験で用いた健康 BALB/c マウスの腸内優勢菌種である *Lactobacillus reuteri*（以下、Lr）を分離培養し実験に用いた。

### *Lactobacillus* 投与マウスモデルの作成

*Lactobacillus* 投与マウスは、健康な BALB/c マウス (6 週齢) を第 1 章で述べた抗生剤 (ABT) 処置マウスを基に下記の要領で作成した。先ず始めに、ABT 処置マウスは、前章と同様に ABT を 1 週間飲水投与した後、滅菌水道水と滅菌飼料を 1 週間与えた。投与に用いた各 *Lactobacillus* 菌株は、10% スキムミルク (雪印メグミルク株式会社、東京、日本) で培養後、6000 rpm、30 分間で遠心し菌体を回収し、PBS を用いて洗浄後、下記要領で給与飼料と混合した。*Lactobacillus* 菌と滅菌粉末飼料 (CE2、日本クレア株式会社、東京、日本) を重量 1:1 で混合し *Lactobacillus* 菌混入飼料を作成した。各マウス群には、上記 *Lactobacillus* 菌飼料を 1 頭あたり 1 日  $10^8$  CFU を 1 週間給餌した。各 *Lactobacillus* 投与群は、Lp1 群、Lp14917 群、または Lr 群とした。また、ABT 無処置で、乳酸菌非投与の健康マウスを対照 (CN) 群として、上記マウスと同様の滅菌飼料と給水管理を行った。抗生剤投与から 2 週間後 (8 週齢時) に剖検し、直腸便、腸間膜リンパ節 (MLN)、

パイエル板(PP)および脾臓を採取した。本研究は、酪農学園大学実験動物委員会における動物倫理審査の承認(VH14A3)を受け遂行した。

#### 腸内細菌の培養法による生菌数解析

糞便処理と培養法は、前章の記載に準じて実施した。培養に用いた選択培地は、変法 LBS 寒天培地(日水製薬株式会社、東京、日本)、BS 寒天培地(日水製薬株式会社)、DHL 寒天培地(日水製薬株式会社)、GAM 寒天培地(日水製薬株式会社)とし、それぞれ 37℃で培養を行った。培養終了後、各寒天培地のコロニー数を計測し、糞便 1 g 当たりの CFU を算出した。本研究で使用した培地で測定できる菌種は、変法 LBS 寒天培地は *Lactobacillus* 属菌、BS 寒天培地は *Bifidobacterium* 属菌、DHL 寒天培地は大腸菌群、GAM 寒天培地は総嫌気性菌である。

#### サイトカイン遺伝子発現

各マウス群から採取した MLN、PP ならびに脾臓からナイロンメッシュにて濾過し塩化アンモニウム(0.8%)で溶血して PBS で洗浄し単核球細胞を得た。T 細胞の刺激応答を解析するために、脾細胞をコンカナバリン A (Con A) (3  $\mu$ g/ml) で 5 時間刺激した。その後、細胞から RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出した。得られた RNA から、First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて、oligo dT プライマーにて cDNA を合成した。測定したサイトカインは、以下の 8 種類(IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17 ならびに TGF- $\beta$ )で、内在性コントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を測定した。各遺伝子発現は、QuantiTect SYBR Green kit (QIAGEN)を用いて Light cycler (Roche)で解析した。得られた

データは、GAPDH 遺伝子発現より標準化した。サイトカイン遺伝子発現を測定するために用いた PCR プライマーは、IFN- $\gamma$ , sense 5' -TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAA-3', antisense 5' -GTTGTTGCTGATGGCCTGAT-3' : IL-6, sense 5' -CAGAGGATACCACTCCCAACA-3', antisense 5' -TGAATTGCCATTGCACAAC: IL-13, sense 5' -CCAGGGCTACACAGAAGTGC-3' : TGF- $\beta$ , sense 5' -AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3', antisense 5' -CAATTCCTGGCGTTACCTTG-3' and GAPDH, sense 5' -CGTGAGTGGAGTCATACTGAT-3', antisense 5' -AACGGATTTGGCCGTATTG-3' である。IL-4, IL-10, IL-12, および IL-17 遺伝子発現は、 QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) を用いて測定した。

## 統計処理

統計上の有意差検定は、Dunnett 法により ABT 群と各 *Lactobacillus* 投与群の検定を行い、各 *Lactobacillus* 投与群間では Tukey-Kramer 法により検定を行い、 $p$  値が 0.05 未満の場合は有意差があると判定した。

### 3. 結果

#### 腸内細菌叢の解析

ABT 処置後の *Lactobacillus* 投与による腸内細菌叢の変化を培養法により比較した結果を表 2 に示す。総嫌気性菌(総生菌数)の比較において、ABT 群は、 $9.1 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、各 *Lactobacillus* 投与群は、Lp1 群が  $9.4 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ 、Lp14917 群が  $9.2 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、Lr 群が  $9.3 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$  となり、群間に有意な差を認めなかった。*Lactobacillus* 属菌は、ABT 群では、第 1 章の結果と同様に検出されず、*Lactobacillus* 投与群においては、Lp1 群が  $9.3 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ 、Lp14917 群が  $9.2 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$ 、Lr 群が  $9.2 \pm 0.1 \log \text{CFU/g}$  となり、全てで検出され各群間に差は認められなかった。*Bifidobacterium* 属菌は、ABT 群が  $8.1 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、Lp1 群が  $8.0 \pm 0.2 \log \text{CFU/g}$ 、Lp14917 群が  $7.9 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 、Lr 群が  $7.8 \pm 0.4 \log \text{CFU/g}$  となり、ABT 群と各 *Lactobacillus* 投与群に差は認められなかった。大腸菌群は、ABT 群が  $4.8 \pm 0.5 \log \text{CFU/g}$ 、Lp1 群が  $4.9 \pm 0.2 \log \text{CFU/g}$ 、Lp14917 群が  $4.8 \pm 0.2 \log \text{CFU/g}$ 、Lr 群が  $4.7 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$  となり、各群間に差は認められなかった。

#### 腸管リンパ器官組織のサイトカイン発現

*Lactobacillus* 投与マウスにおける、MLN と PP 由来のリンパ球のサイトカイン(IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, ならびに TGF- $\beta$ ) 遺伝子発現を測定した結果を表 3 (MLN) および、表 4 (PP) に示した。MLN において、*Lactobacillus* を投与した 3 群は、ABT 群と比較して測定したすべてのサイトカイン発現が増加した。特に、Lp1 群において、IL-10 発現が ABT 群より有意に増加した( $p < 0.05$ )。Lp14917 群と Lr 群は、ABT 群と比較して TGF- $\beta$  発現が有意

に増加した( $p < 0.05$ )。

PP におけるサイトカイン遺伝子発現は、*Lactobacillus* 投与全群において、IL-6、IL-10、ならびに IL-17 発現の増加が確認された。その中でも Lp1 群は、ABT 群と比較して、IL-6 と IL-10 の発現が有意に増加した( $p < 0.05$ )。

#### 脾細胞の Con A に対するサイトカイン応答

*Lactobacillus* 投与群の Con A 刺激に対する脾細胞のサイトカイン応答の結果を表 5 に示す。ABT 群との比較において、Lp1 群は、測定したすべてのサイトカイン発現(IFN- $\gamma$ ，IL-4，IL-6，IL-10，IL-13，IL-17，ならびに TGF- $\beta$ )が増加し、特に、IFN- $\gamma$  と IL-10 発現が有意に増加した( $p < 0.05$ )。Lp14917 群と Lr 群も、測定した全てのサイトカイン発現が増加傾向を示したが、ABT 群に対する有意差は認められなかった。*Lactobacillus* 投与群間で比較すると、Lp1 群は、他の投与群(Lp14917 群と Lr 群)と比較して、IFN- $\gamma$  発現が有意に増加した( $p < 0.05$ 、図 7)。

表 2. *Lactobacillus* 投与マウスの腸内細菌叢の構成 (培養法)

|                           | ABT 群<br>(n=6) | Lp1 群<br>(n=4) | Lp14917 群<br>(n=4) | Lr 群<br>(n=4) |
|---------------------------|----------------|----------------|--------------------|---------------|
| <i>Lactobacillus</i> 属菌   | 検出限界以下         | 9.3 ± 0.1      | 9.2 ± 0.1          | 9.2 ± 0.1     |
| <i>Bifidobacterium</i> 属菌 | 8.1 ± 0.3      | 8.0 ± 0.2      | 7.9 ± 0.3          | 7.8 ± 0.4     |
| 大腸菌群                      | 4.8 ± 0.5      | 4.9 ± 0.2      | 4.6 ± 0.2          | 4.7 ± 0.3     |
| 総嫌気性菌                     | 9.1 ± 0.3      | 9.4 ± 0.1      | 9.2 ± 0.3          | 9.3 ± 0.1     |

抗生剤処置 (ABT) 群と *Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) の各群マウスの直腸便の生菌数を選択培地を用いて測定し、検出菌を log CFU/g の平均±標準誤差 (SE) とし表に示した。



表 3. 腸間膜リンパ節 (MLN) のサイトカイン遺伝子発現

|               | ABT 群       | Lp1 群        | Lp14917 群    | Lr 群         |
|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| IL-12         | 0.47 ± 0.13 | 0.63 ± 0.31  | 1.39 ± 1.21  | 0.71 ± 0.47  |
| IFN- $\gamma$ | 0.40 ± 0.22 | 1.16 ± 1.09  | 0.81 ± 0.84  | 0.71 ± 0.62  |
| IL-4          | 0.52 ± 0.29 | 1.48 ± 0.97  | 0.94 ± 0.31  | 1.08 ± 0.35  |
| IL-6          | 0.37 ± 0.40 | 1.31 ± 0.50  | 1.65 ± 1.78  | 1.21 ± 0.41  |
| IL-13         | 0.76 ± 0.22 | 1.86 ± 0.83  | 1.88 ± 0.59  | 1.63 ± 0.45  |
| IL-17         | 0.55 ± 0.41 | 0.88 ± 0.18  | 0.99 ± 0.45  | 1.31 ± 0.89  |
| TGF- $\beta$  | 0.24 ± 0.10 | 0.80 ± 0.32  | 0.98 ± 0.41* | 1.02 ± 0.49* |
| IL-10         | 0.66 ± 0.41 | 1.94 ± 0.67* | 0.84 ± 0.34  | 0.71 ± 0.62  |

MLN のサイトカイン発現をリアルタイム PCR により測定し、GAPDH で標準化した。

数値は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$  (抗生剤処置 (ABT) 群と各 *Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) と比較)

表 4. パイエル板(PP)のサイトカイン遺伝子発現

|               | ABT 群       | Lp1 群        | Lp14917 群   | Lr 群        |
|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| IL-12         | 0.82 ± 0.29 | 0.90 ± 0.50  | 0.76 ± 0.27 | 0.63 ± 0.32 |
| IFN- $\gamma$ | 0.53 ± 0.21 | 0.73 ± 0.37  | 0.43 ± 0.28 | 0.69 ± 0.58 |
| IL-4          | 0.84 ± 0.35 | 0.57 ± 0.21  | 0.37 ± 0.25 | 0.37 ± 0.24 |
| IL-6          | 0.16 ± 0.14 | 1.13 ± 0.49* | 0.37 ± 0.26 | 0.36 ± 0.23 |
| IL-13         | 0.85 ± 0.46 | 1.20 ± 0.60  | 0.85 ± 0.50 | 0.92 ± 0.36 |
| IL-17         | 0.69 ± 0.34 | 0.92 ± 0.58  | 1.03 ± 0.21 | 0.88 ± 0.59 |
| TGF- $\beta$  | 0.90 ± 0.31 | 1.12 ± 0.58  | 0.87 ± 0.23 | 0.77 ± 0.07 |
| IL-10         | 0.38 ± 0.23 | 1.40 ± 0.38* | 0.65 ± 0.42 | 0.70 ± 0.36 |

PP のサイトカイン発現をリアルタイム PCR により測定し、GAPDH で標準化した。

数値は、対照(CN)群を 1 とした時の相対発現量を示した(n=4)。\*  $p < 0.05$  (抗生剤処置(ABT)群と各 *Lactobacillus* 投与群(Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群)と比較)

表 5. コンカナバリン A (Con A) 刺激による脾細胞のサイトカイン応答

|               | ABT 群           | Lp1 群            | Lp14917 群       | Lr 群            |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| IFN- $\gamma$ | 0.07 $\pm$ 0.02 | 1.06 $\pm$ 0.23* | 0.24 $\pm$ 0.13 | 0.12 $\pm$ 0.03 |
| IL-4          | 0.53 $\pm$ 0.16 | 1.00 $\pm$ 0.51  | 0.86 $\pm$ 0.23 | 0.72 $\pm$ 0.20 |
| IL-6          | 0.16 $\pm$ 0.07 | 1.01 $\pm$ 0.34  | 1.44 $\pm$ 0.97 | 1.09 $\pm$ 0.99 |
| IL-13         | 0.05 $\pm$ 0.03 | 0.49 $\pm$ 0.19  | 0.29 $\pm$ 0.40 | 0.35 $\pm$ 0.33 |
| IL-17         | 0.61 $\pm$ 0.19 | 0.79 $\pm$ 0.10  | 0.97 $\pm$ 0.33 | 0.86 $\pm$ 0.34 |
| TGF- $\beta$  | 0.68 $\pm$ 0.42 | 0.96 $\pm$ 0.84  | 0.99 $\pm$ 0.34 | 1.01 $\pm$ 0.27 |
| IL-10         | 0.52 $\pm$ 0.14 | 0.99 $\pm$ 0.21* | 0.52 $\pm$ 0.16 | 0.53 $\pm$ 0.13 |

Con A を用いて刺激した脾細胞のサイトカイン発現をリアルタイム PCR により測定し、GAPDH で標準化した。数値は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$  (抗生剤処置 (ABT) 群と各 *Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) と比較)

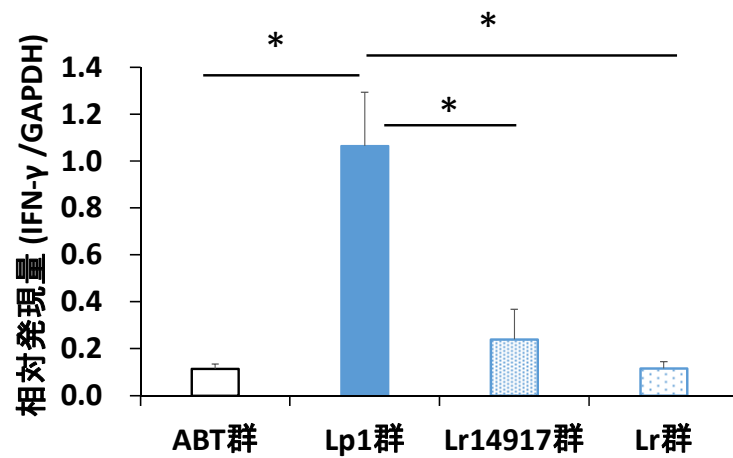


図 7. *Lactobacillus* 菌株投与による脾細胞における IFN- $\gamma$  発現

*Lactobacillus* 菌株投与マウスの脾細胞を Con A で刺激しサイトカイン発現を測定し、GAPDH で標準化した。縦軸は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$

#### 4. 考察

プロバイオティクスとして使用される *Lactobacillus* 属菌は、腸内細菌叢の改善や自然免疫機能の向上を期待して使用されている[64]。ABT 処置により、腸内細菌叢が変化したマウスは、サイトカイン発現の低下や CD3 陽性細胞割合の減少が確認された。そこで、第 2 章では、これら ABT 処置マウスに *Lactobacillus* 菌株を投与し、そのマウスのリンパ球における刺激応答に対する影響を比較検討した。

本章における *Lactobacillus* 菌株は、*L. plantarum* Lp1 株、標準菌株 *L. plantarum* 14917T 株、およびマウス腸内に優勢菌種である *L. reuteri* を使用した。各菌株を ABT 処置マウスに投与後、直腸便中の *Lactobacillus* 属菌数を選択培地で検出した。培養の結果、その菌数は ABT 未処置の健常マウスとほぼ同菌数まで増加した。各 *Lactobacillus* 投与群における総嫌気性菌、*Bifidobacterium* 属菌、大腸菌群の菌数においても、各群類似した菌数が検出され、*Lactobacillus* 属菌投与による生菌数変化は確認されなかった。従って本章における乳酸菌投与は ABT 処置により減少した乳酸菌群の総菌数を補完するに充分であり、また他の菌種の菌数に変動を与えていないことが推察された。

*Lactobacillus* は、腸管の疾患である食物アレルギーや炎症性腸疾患の症状を緩和するとの報告がある[35, 61]。第 1 章では、ABT 処置したマウスは、MLN、PP のサイトカイン(IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, ならびに TGF- $\beta$ )発現の低下を示した。それらマウスに、各 *Lactobacillus* 菌株を投与した 3 群は、ABT 群と比較して、MLN はすべてのサイトカイン発現、PP は IL-6、IL-10、ならびに IL-17 発現が共通して投与群で発現が増強していた。特に、Lp1 群は MLN 中の IL-10 発現が有意に増加した。PP においても同様に IL-6 と IL-10 の発現が有

意に増加していた。これらの結果についての菌による作用機序は不明であるが、*Lactobacillus* 投与が MLN および PP のサイトカイン産生に影響を与えることが示された。今回、Lp1 群で発現増強された IL-10 は、炎症制御の役割を担う分子である。腸管のリンパ器官における IL-10 産生は、腸管の免疫寛容において重要な役割をもつことから[59]、Lp1 株は、腸管免疫応答を調整する可能性が推察された。

次に、Con A 刺激した脾細胞のサイトカイン発現を調べると、Lp1 群と他の乳酸菌投与群(Lp14917 株、あるいは Lr 株)では異なる結果を示した。Lp1 群は、IFN- $\gamma$  と IL-10 発現が他の投与群と比べ有意に上昇した。両サイトカインの生体における役割のうち IFN- $\gamma$  は、ヘルパーT 細胞 1 型(Th1 型)の免疫応答により産生され、細胞性免疫を活性化する。また、ヘルパーT 細胞 2 型(Th2 型)免疫の過剰応答により引き起こされるアレルギー性喘息において、IFN- $\gamma$  は Th2 型応答を制御しアレルギー症状の緩和をする[42]。一方、IL-10 は炎症反応を制御する作用が報告されている[41]。今回得られた知見は、リンパ球系細胞の刺激応答性が *Lactobacillus* の菌株により異なることを示し、Lp1 株投与は、IFN- $\gamma$  や IL-10 発現の増加をともなって生体の免疫応答に影響する可能性が示唆された。*Lactobacillus* の免疫賦活化効果は、その構成成分である細胞壁成分が作用することが明らかとなっている。*L. plantarum* のテイコ酸がマクロファージに取り込まれ IL-10 産生を促進することや[29]、*L. johnsoni* 由来のペプチドグリカンがマクロファージによる IL-12 産生応答を抑制することが報告がされている[62]。本研究では、*Lactobacillus* 菌体全体を経口投与した時の結果であり、菌体のどの成分が作用したかどうかは不明であるが、Lp1 株投与による脾細胞の IFN- $\gamma$  と IL-10 応答の増強効果があることが示唆された。

## 5. 小括

第2章では、抗生剤処置(ABT)マウスに3種の *Lactobacillus* を経口投与した結果、以下の知見を得た。

- ① *Lactobacillus* 投与は、ABT 群と比較して腸間膜リンパ節(MLN)やパイエル板(PP)における IL-6、IL-10 ならびに IL-17 発現を増加させ、その発現程度は菌株により異なる事が確認された。特に、Lp1 投与群は、他の菌株投与群と比べ、IL-10 発現が有意に増加した。
- ② *Lactobacillus* 投与群間における Con A 刺激による脾細胞は、IFN- $\gamma$  と IL-10 発現の有意な増加が Lp1 投与群で確認された。

以上の結果より、腸内細菌叢の変化は、腸管近傍のリンパ組織器官のみならず、脾臓におけるサイトカイン発現に影響を与えることが示唆された。さらに、*Lactobacillus* 菌株の種類により宿主への免疫応答能が異なることを明らかにした。

### 第3章 腸内細菌叢の構成変化と炎症応答への影響

#### 1. 序文

先進国においてアトピー性皮膚炎、食物アレルギー、喘息といったアレルギー疾患の発症率は増加し、先進国の人口の約30～40%に達しており、大きな社会問題となっている[51]。

腸内細菌叢の構成は、アレルギー性疾患や炎症性疾患の発生率と関連することが指摘されている[8, 53]。そのため、腸内細菌叢の構成や機能に有益な影響を与えるプロバイオティクスはアレルギー疾患の改善に対する適用が期待されている。プロバイオティクス投与による腸内細菌叢の改善は、消化管の炎症や食物アレルギーを抑制することや[37, 61, 63]、肺炎やアトピー性皮膚炎などに対しても炎症抑制作用を有することが報告されている[26, 58]。

アレルギー疾患とは後天的な免疫異常に起因し、またアレルギー性鼻炎や花粉症のようなI型アレルギーはアレルギー抗原に対し主にヘルパーT細胞2型(Th2)細胞の過剰な免疫反応によって引き起こされる[33, 56]。これらのI型アレルギー疾患に対し、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ を産生するヘルパーT細胞1型(Th1)細胞やIL-10やTGF- $\beta$ を産生し免疫制御の役割を担う制御性T細胞の免疫応答が症状緩和に関与する報告があり[15, 42]、気管支喘息の患者において、主にインターロイキン(IL)-17産生するTh17細胞の応答は病態形成に関連している報告がされている[2, 40]。以上のことから、Th2細胞の過剰な反応は、自己免疫疾患や気管支喘息のアレルギー疾患の発病の背景因子として関与している[1]。第1章と第2章において、抗生剤(ABT)処置により腸内細菌叢の変化したマウスは、CD3陽性細胞の割合とCon Aに対するリンパ球の反応性が異なり、



T 細胞が産生するサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, ならびに TGF- $\beta$ ) 発現が減弱することが示された。また、その個体に乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* Lp1 株を投与すると IFN- $\gamma$  や IL-10 発現が増加することが確認された。以上のことから、腸内細菌叢の構成が T 細胞の刺激応答に影響を与えることが示された。しかし、ABT 処置による抗原特異的な炎症誘導やリンパ球の応答性変化については不明である。そこで本章では、ABT 処置により腸内細菌叢の構成を変化させたマウスを用いて、卵白アルブミン (OVA) による肺炎症を誘導させ、その炎症程度の変化と乳酸菌投与による肺炎症の制御について検討した。

## 2. 材料・方法

### ABT 処置マウスと乳酸菌投与

腸内細菌叢の異なるモデルマウスは、前章と同様の方法で作成した。マウスは、滅菌ケージ、滅菌床敷き、滅菌水道水、および滅菌飼料で管理した。マウスは、ABT 処置を 1 週間、自由飲水にて投与した後、滅菌水道水と滅菌飼料を実験期間中与えた。試験に用いた乳酸菌は、前章で述べた 3 種の *Lactobacillus* 菌株を使用した。乳酸菌投与マウスは、ABT 処置後各 *Lactobacillus* 菌飼料を 1 頭あたり 1 日  $10^8$  CFU 以上になるよう実験期間中給餌した（第 2 章の方法に準ずる）。各投与マウス群は、Lp1 群、Lp14917 群、ならびに Lr 群とした。ABT 群は、ABT 処置後乳酸菌を投与せずに飼育した群であり、対照マウス（以下、CN 群）は ABT 処置をせず滅菌水道水と滅菌飼料を期間中投与した。本研究は、酪農学園動物実験委員会の承認（VH14A3）を受けて実施した。

### 卵白アルブミン (OVA) 誘導性肺炎モデル

OVA 誘導性肺炎モデルは、既報の方法に従い乳酸菌投与開始後 1 週間からマウスに OVA を免疫して作成した[21]。方法は、OVA (OVA grade V, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands) 0.1 mg と水酸化アルミニウム (Pierce, Perbio Science Nederland, Etten-Leur, The Netherlands) 20 mg を PBS 1 ml に溶解し、1 週間間隔で 2 回、マウス 1 頭あたり 0.1 ml 腹腔内注射した。免疫処置の 2 週間後、OVA 20  $\mu$ l (OVA 0.2 mg/20  $\mu$ l) を 2 日おきに 3 回マウスの鼻腔内に投与し、肺への炎症誘導を行った。3 回目の炎症誘導後から 3 日後に、肺と肺胞洗浄液 (BALF) 細胞を採材した。

## 肺の病理組織学的評価

採材した肺は、20%ホルマリン PBS で 20 時間固定した後、70%エタノールに浸漬し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋組織は、ミトクロームにより厚さ 1.5  $\mu\text{m}$  に薄切し、2% 3-aminopropyltriethoxysilane (信越化学工業株式会社、東京、日本)で被覆したスライドガラスに載せ、パラフィン切片を作成した。パラフィン切片は、脱パラフィン後、定法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。HE 染色後の標本を用い鏡検を実施した。評価は、気管支周囲の炎症性細胞の浸潤と病変形成から、軽度な炎症レベルを 1、中レベルを 2、重症レベルを 3 として、病変をスコア化し評価した (図 8)。

## OVA 抗原特異的サイトカイン応答

上記の OVA 肺炎症誘導と同様の方法で ABT 処置乳酸菌投与マウスに OVA 免疫を行った。これらマウスにおける OVA 抗原特異的なサイトカイン遺伝子発現を測定するために、最終免疫 2 週間後に各マウスから、脾臓と気管支リンパ節を採材した。各組織から回収したリンパ球 ( $10^5$ )に OVA 抗原(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を 5 時間刺激し、刺激後のリンパ球のサイトカイン遺伝子発現を以下の方法で測定した。

## サイトカイン遺伝子発現の測定

OVA 炎症誘導 8 日後の BALF 細胞、ならびに OVA 刺激リンパ球から RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)により RNA を抽出した。得られた RNA から、First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland)を用いて、oligo d(T)プライマーにて cDNA を合成した。各サイトカイン(IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TGF- $\beta$ , 腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ ならびに内在性コントロールとして GAPDH)の mRNA の発現を、QuantiTect SYBR Green kit (QIAGEN)を用

いて Light cycler (Roche) で解析した。得られたデータは、GAPDH 遺伝子発現より標準化した。サイトカイン遺伝子発現を測定するために用いた PCR プライマーは、IFN- $\gamma$ , sense 5' -TGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAA-3', antisense 5' -GTTGTTGCTGATGGCCTGAT-3' : IL-1 $\beta$ , sense 5' -CCCAGGTCAAAGGTTTGGAA-3', antisense 5' -TCCTTGTGCAAGTGTCTGAAG-3' : IL-6, sense 5' -CAGAGGATACCACTCCCAACA-3', antisense 5' -TGAATTGCCATTGCACAAC-3' : IL-13, sense 5' -CCAGGGCTACACAGAAGTGC-3' : TGF- $\beta$ , sense 5' -AGCCCTGTATTCCGTCTCCT-3', antisense 5' -CAATTCCTGGCGTTACCTTG-3' and GAPDH, sense 5' -CGTGAGTGGAGTCATACTGAT-3', antisense 5' -AACGGATTTGGCCGTATTG-3' である。IL-4, IL-10, IL-17、および TNF- $\alpha$  遺伝子発現は、QuantiTect Primer Assays を用いて測定した。

#### 統計処理

統計上の有意差検定は、CN 群と ABT 群の群間は、Student's t-test で行い、多重比較において、ABT 群と各 *Lactobacillus* 投与群の群間は、Dunnett 法、また、Tukey-Kramer 法により検定し、 $p$  値が 0.05 未満の場合は有意差があると判定した。

### 3. 結果

#### 肺組織の病理学的炎症評価

OVA 誘導性肺炎モデルマウスにおける炎症スコアの結果を図 9 に示す。肺組織の炎症スコアは、CN 群では  $1.1 \pm 0.6$ 、ABT 群では  $2.4 \pm 0.5$  となり、ABT 群で有意に増加した ( $p < 0.05$ )。 *Lactobacillus* 投与群では、Lp1 群は  $1.0 \pm 0.6$ 、Lp14917 群は  $2.0 \pm 0.4$ 、Lr 群は  $2.1 \pm 0.2$  となり、ABT 群と比較して、Lp1 群でのみ有意なスコア低下が確認された ( $p < 0.05$ )。

#### BALF 細胞中の炎症性サイトカイン発現

炎症個体の BALF 細胞中の炎症性サイトカインの結果を表 6 に示す。CN 群の BALF 細胞における IL-1 $\beta$  発現は、炎症スコアが高い数値を示した ABT 群を 1 とした場合、その相対発現量は  $0.3 \pm 0.3$  となり ABT 群より減少した。 *Lactobacillus* 投与した場合の相対発現量は、Lp1 群が  $0.2 \pm 0.1$ 、Lp14917 群が  $0.6 \pm 0.3$ 、Lr 群が  $0.8 \pm 0.4$  となり、ABT 群と比較した場合、Lp1 群のみ有意な減少が認められ、炎症スコアの低下と同様の傾向を示した ( $p < 0.05$ )。 IL-6 の相対発現量は、CN 群が  $0.7 \pm 1.9$ 、Lp1 群が  $0.9 \pm 0.6$ 、Lp14917 群が  $1.1 \pm 0.5$ 、Lr 群が  $1.0 \pm 0.5$ 、TNF- $\alpha$  の相対発現量は、CN 群が  $1.5 \pm 0.9$ 、Lp1 群が  $1.9 \pm 2.1$ 、Lp14917 群が  $1.6 \pm 1.1$ 、Lr 群が  $2.6 \pm 1.8$  となり、両遺伝子共に各群間に有意な差は認められなかった。

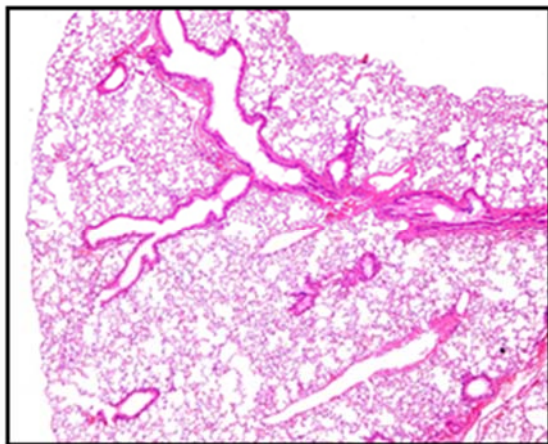
炎症スコアと BALF 細胞中のサイトカイン遺伝子発現の相関係数を表 5 に示す。炎症スコアと IL-1 $\beta$  の相関係数は 0.604 となり有意な正の相関が認められたが、他のサイトカインとは相関は確認できなかった ( $p < 0.01$ )。

#### OVA 特異的サイトカイン応答

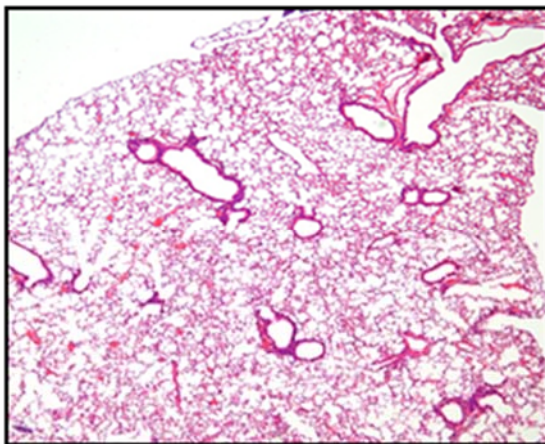
免疫マウスの脾細胞における OVA 抗原特異的なサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, ならびに TGF- $\beta$ ) 遺伝子発現を測定した結果を表 7、気管支リンパ節において測定した結果を表 8 に示す。ABT 群は、CN 群と比較し、脾細胞で IL-13 と IL-17 発現が増加し、気管支リンパ節で IL-6、IL-13 と IL-17 発現が増加した。特に、脾細胞の IL-13 発現と気管支リンパ節の IL-6 発現は有意に増加した ( $p < 0.05$ )。

*Lactobacillus* 投与群と ABT 群の比較において、Lp1 群では、脾細胞で IL-13 発現が有意に減少し、IL-10 発現が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。気管支リンパ節では、IL-6 発現が有意に減少し、また IL-10 発現が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。*Lactobacillus* 投与群間で比較において、Lp1 群は、他群と比較して有意に IL-10 発現が増加した ( $p < 0.05$ 、図 10)。

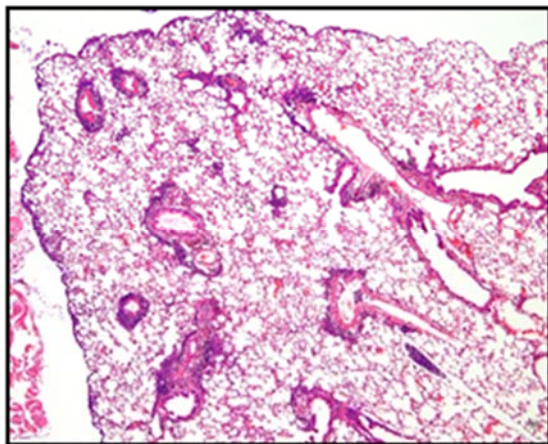
A.



B.



C.



D.

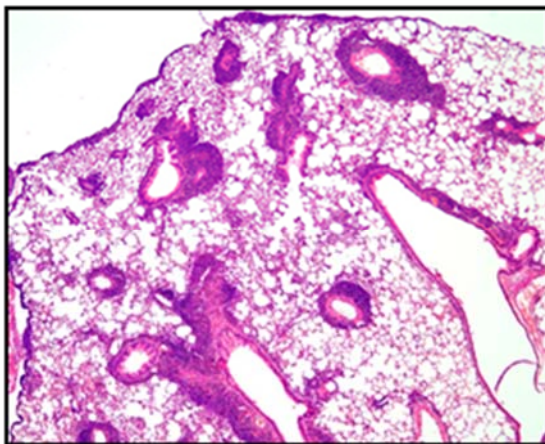


図 8. 肺組織の病理組織学的評価スコア

肺組織における気管支周囲の炎症性細胞の浸潤の様相から軽度、中程度、重症の3つに分類した。それぞれのスコアは軽度を1、中程度を2、重症を3とした。それぞれA：健常個体の組織、B：OVA誘導により軽度炎症を示した、C：OVA誘導により中程度炎症を示した、D：OVA誘導により重症を示した。

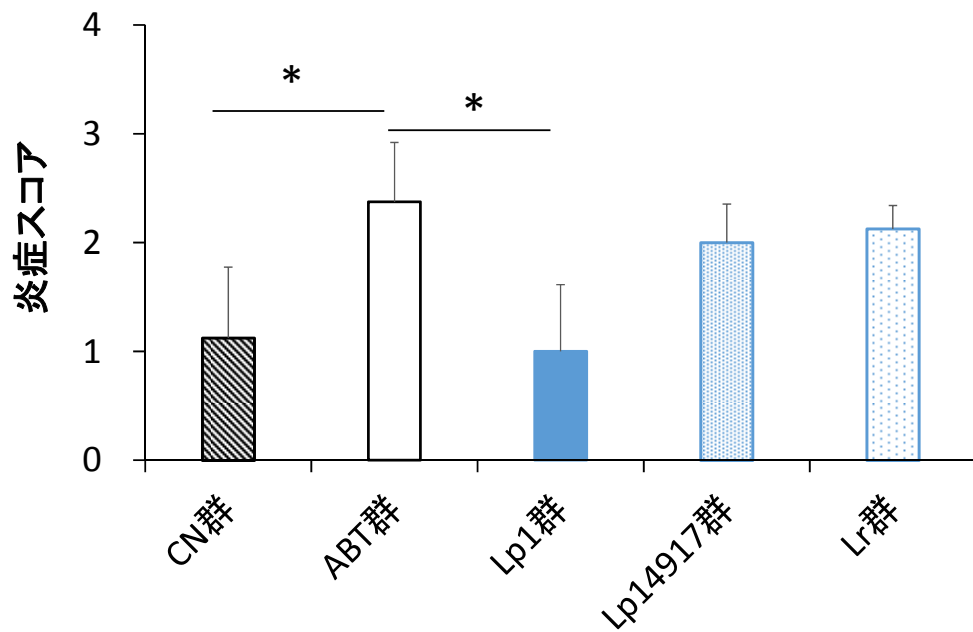


図 9. OVA 誘導性肺炎症における炎症スコア

肺組織における気管支周囲の炎症性細胞の浸潤程度から、軽度を 1、中程度を 2、または重症を 3 として、病変をスコアし、各群のスコア平均値を示した (n=4)。

\*  $p < 0.05$



表 6. 肺胞洗浄液 (BALF) 細胞中のサイトカイン遺伝子発現と炎症スコアに対する相関係数

|               | ABT 群           | Lp1 群            | Lp14917 群       | Lr 群            | 相関係数    |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|---------|
| IL-1 $\beta$  | 2.84 $\pm$ 1.06 | 0.49 $\pm$ 0.37* | 1.63 $\pm$ 0.95 | 2.20 $\pm$ 1.20 | 0.604** |
| IL-6          | 1.41 $\pm$ 1.87 | 1.24 $\pm$ 0.90  | 1.54 $\pm$ 0.68 | 1.34 $\pm$ 0.70 | 0.003   |
| TNF- $\alpha$ | 0.67 $\pm$ 0.23 | 1.29 $\pm$ 1.41  | 1.04 $\pm$ 0.72 | 1.73 $\pm$ 1.23 | -0.180  |

BALF 細胞中の各サイトカイン遺伝子発現をリアルタイム PCR により測定し、GAPDH 発現で標準化した。対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (抗生剤処置 (ABT) 群と *Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) の比較)

表 7. 脾細胞の OVA 抗原特異的サイトカイン遺伝子発現

|               | ABT 群             | Lp1 群            | Lp14917 群        | Lr 群            |
|---------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|
| IFN- $\gamma$ | 2.84 $\pm$ 1.73   | 1.95 $\pm$ 1.16  | 1.32 $\pm$ 0.31  | 1.36 $\pm$ 0.65 |
| IL-4          | 1.23 $\pm$ 0.41   | 1.31 $\pm$ 0.68  | 1.26 $\pm$ 0.82  | 1.41 $\pm$ 0.63 |
| IL-6          | 1.43 $\pm$ 0.27   | 0.64 $\pm$ 0.31  | 1.21 $\pm$ 0.66  | 1.37 $\pm$ 1.01 |
| IL-13         | 9.99 $\pm$ 2.33** | 1.73 $\pm$ 0.85* | 10.71 $\pm$ 6.29 | 11.07 $\pm$ 4.8 |
| IL-17         | 2.69 $\pm$ 1.14   | 1.44 $\pm$ 0.63  | 3.39 $\pm$ 1.22  | 2.66 $\pm$ 0.47 |
| TGF- $\beta$  | 1.06 $\pm$ 0.52   | 1.04 $\pm$ 0.54  | 0.79 $\pm$ 0.46  | 1.29 $\pm$ 0.65 |
| IL-10         | 0.50 $\pm$ 0.17   | 2.25 $\pm$ 0.94* | 0.40 $\pm$ 0.25  | 0.44 $\pm$ 0.35 |

OVA により免疫したマウスの脾細胞を *in vitro* で OVA 抗原と再刺激しサイトカイン遺伝子発現を測定し、GAPDH 発現で標準化した。数値は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (抗生剤処置 (ABT) 群は CN 群と比較、*Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) は ABT 群と比較)

表 8. 気管支リンパ節の OVA 抗原特異的サイトカイン遺伝子発現

|               | ABT 群            | Lp1 群            | Lp14917 群       | Lr 群            |
|---------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| IFN- $\gamma$ | 1.22 $\pm$ 0.34  | 1.42 $\pm$ 0.85  | 1.08 $\pm$ 0.08 | 1.00 $\pm$ 0.69 |
| IL-4          | 1.42 $\pm$ 0.78  | 0.99 $\pm$ 0.74  | 1.23 $\pm$ 0.27 | 0.96 $\pm$ 0.25 |
| IL-6          | 2.99 $\pm$ 1.10* | 1.03 $\pm$ 0.52* | 2.13 $\pm$ 0.88 | 3.13 $\pm$ 1.39 |
| IL-13         | 1.97 $\pm$ 0.68  | 0.81 $\pm$ 0.24  | 2.55 $\pm$ 0.80 | 1.76 $\pm$ 0.71 |
| IL-17         | 2.70 $\pm$ 1.40  | 0.98 $\pm$ 0.59  | 2.54 $\pm$ 1.33 | 2.60 $\pm$ 1.21 |
| TGF- $\beta$  | 0.86 $\pm$ 0.48  | 0.69 $\pm$ 0.23  | 0.65 $\pm$ 0.46 | 0.60 $\pm$ 0.15 |
| IL-10         | 0.37 $\pm$ 0.11  | 2.58 $\pm$ 0.96* | 0.60 $\pm$ 0.24 | 0.57 $\pm$ 0.23 |

OVA により免疫したマウスの気管支リンパ節を *in vitro* で OVA 抗原と再刺激しサイトカイン遺伝子発現を測定し、GAPDH 発現で標準化した。数値は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$  (抗生剤処置 (ABT) 群は CN 群と比較、*Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) は ABT 群と比較)

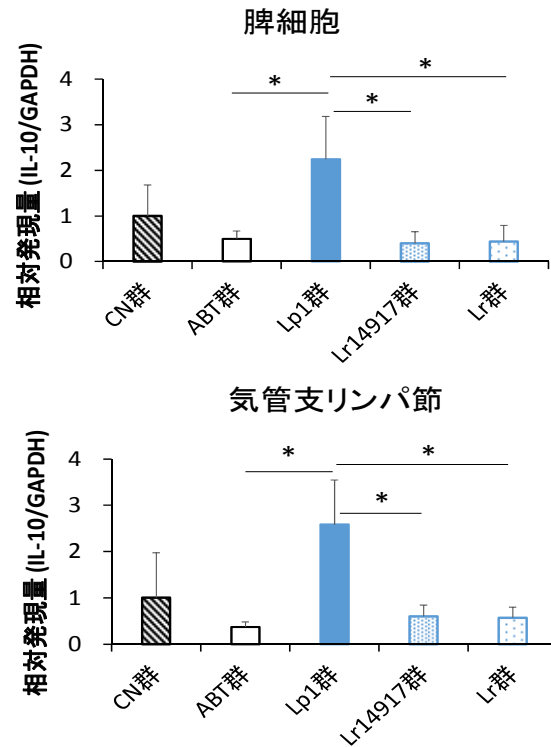


図 10. 脾細胞と気管支リンパ節の OVA 特異的 IL-10 遺伝子発現

OVA により免疫したマウスの脾細胞と気管支リンパ節を *in vitro* で OVA 抗原と再刺激しサイトカイン遺伝子発現を測定し、GAPDH 発現で標準化した。数値は、対照 (CN) 群を 1 とした時の相対発現量を示した (n=4)。\*  $p < 0.05$  (*Lactobacillus* 投与群 (Lp1 群、Lp14917 群、および Lr 群) と抗生剤処置 (ABT) 群と比較)

#### 4. 考察

腸内の細菌叢構成の変化がアレルギー疾患患者に認められる研究報告がある[4, 20, 52, 57]。それらの背景は、抗生剤の投与や食生活の変化が要因の一つとして腸内細菌が乱れることが指摘され、その菌叢改善を目的としたプロバイオティクスが利用されるようになった。その中で、プロバイオティクスとして利用されている *Lactobacillus* は、幾つかの株でアレルギー性炎症疾患に対し症状の抑制効果を有する事が報告されている[35, 37, 44, 61]。

第1章において、抗生剤(ABT)処置されたマウスのリンパ球は Con A 刺激によるサイトカイン発現が低下することを明らかとした。第2章では、ABT 処置マウスに *Lactobacillus* 投与すると、発現低下したサイトカインが回復し、その反応は株特異的であることが示された。特に Lp1 株の投与が、IFN- $\gamma$  と IL-10 の発現を有意に増加させることが明らかとなった。これらの知見は、腸内細菌叢の構成がリンパ球のサイトカイン発現に影響することを示唆するものであった。そこで第3章では、ABT 処置マウスの OVA 誘導性肺炎症に対する炎症応答を比較し、それらのマウスに乳酸菌を投与した場合の影響を検証した。

OVA 刺激による肺炎症モデルマウスの病変スコアの比較において、ABT 群は CN 群と比べ病変が重症化した。一方で、*Lactobacillus* 投与した Lp1 投与群は、病変スコアの減少が確認された。炎症スコアを群間で比較すると、CN 群と Lp1 群で IL-1 $\beta$  の遺伝子発現が低下しており、炎症スコアと正の相関が認められた。また、Lp1 群における IFN- $\gamma$  と IL-10 の発現が増加したことから、抗原に対する免疫応答が Th1 系にシフトし、IL-10 発現に伴う炎症制御作用が働いた可能性が推察される。

抗原特異的サイトカイン遺伝子発現誘導が乳酸菌投与により影響を受けるか

否かを検討した結果、炎症症状の強かった ABT 群では、リンパ系組織において IL-6、IL-13 ならびに IL-17 発現の増加傾向が認められた。IL-6 と IL-13 は、Th2 系のサイトカインであり、喘息などのアレルギー疾患のエフェクターサイトカインとされ、炎症の際、粘液の分泌および気道圧の上昇を誘導することが知られている[18]。IL-17 は、気道性喘息の病態生理に重要な役割を果たしており、気道炎症存在下における肺への好中球集積誘導や気道平滑筋への直接作用による気道過敏症の誘導が報告されている[40]。本研究における OVA 誘導性肺炎モデルでは、ABT 群における炎症スコアと抗原特異的な IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現が高いことから、OVA 抗原がそれらサイトカイン発現を誘導し炎症スコアを高くしたことが示唆された。興味深いことに、*Lactobacillus* 投与群間で比較すると Lp1 群では、炎症スコアが減少しそれらマウスの IL-6 と IL-13 発現が有意に減少し、IL-17 発現も減少傾向を示した。特に IL-17 発現減少は、*Lactobacillus* の経口投与により IL-17 を産生する Th17 細胞が減少し、自己免疫性疾患を改善する報告と一致する結果であった[73]。Lp1 株のみの経口投与による炎症制御が生じたことから、株特異的な乳酸菌の作用により宿主の免疫機能が修飾されることが推察された。

IL-10 は、免疫抑制を誘導するサイトカインであり、炎症に対し制御的に作用することが知られている[41]。本章において、Lp1 群は、他群と比べ、脾細胞と気管支リンパ節における IL-10 発現を有意に増加させた。IL-10 が、Th2 細胞の機能を阻害することによりサイトカイン応答を制御し、抗原特異的な免疫応答や炎症反応を抑制してアレルギー性炎症の病態を改善する報告があり[15]、抗原特異的な IL-10 発現の増強が本章の結果で示した Lp1 群の炎症スコア低下に影響したことが示唆された。

*Lactobacillus* の免疫応答に対する作用は、生菌だけではなく菌由来の核酸が

免疫機能に作用することも明らかとなっている。*Lactobacillus* 由来の DNA の経口投与が腸炎の症状改善に有効であることや[55]、*L. gasseri* 由来の RNA が CD4 陽性 T 細胞の活性を抑制する報告ある[76]。免疫修飾作用に関する報告では、*Lactobacillus* を含む乳酸菌由来の RNA が樹状細胞からの IFN 産生を誘導し、腸炎に対し抗炎症作用を有することが報告されている[69]。本研究における Lp1 株投与による炎症抑制効果は、Lp1 株の核酸が作用した可能性が考えられる。また、メタゲノム解析において、ABT 群は、*Lactobacillaceae* が CN 群と同比率の核酸の存在が認められたが、炎症悪化がみられた。今後の課題として、*Lactobacillus* の有する抗炎症作用をより詳細に解析するために、*Lactobacillus* のどの成分が炎症応答に関与するか明らかにすることが必要と考えられる。

以上、本章の結果から、ABT 処置による腸内細菌叢の構成変化は、OVA 誘導性肺炎症病態を悪化させることが明らかとなった。また、乳酸菌投与は、菌株特異的に OVA 刺激応答バランスを調整し肺炎症における病態悪化を制御することが示された。Lp1 株の経口投与は、抗原特異的な炎症に関わる IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現の制御とともに IL-10 の発現増加を介して抗原特異的な炎症抑制作用を制御することが示唆された。

## 5. 小括

第3章では、抗生剤 (ABT) 処置により腸内細菌叢の構成を変化させたマウスモデルに卵白アルブミン (OVA) による肺炎症を誘導させ、その炎症変化を乳酸菌投与により制御されるか否かを調べ、以下の知見を得た。

① ABT 群において、OVA 抗原特異的な IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現の増加を伴う炎症スコアの増加が有意に認められた。

② *Lactobacillus* 投与は、ABT 群の炎症を制御した。特に Lp1 株投与は OVA 抗原特異的な IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現の減少と IL-10 発現の増加を伴う炎症抑制に寄与した。

以上の結果より、ABT 処置による腸内細菌叢の構成は、OVA 誘導性肺炎症の炎症病態を悪化させることが示された。Lp1 株の投与は、炎症増悪に関与する IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現の制御と IL-10 発現の増加に伴う炎症制御作用を有することが示された。



## 総括

本論文では、腸内細菌叢の構成の変化に伴う免疫応答への影響についてマウスモデルを用いて解析し、以下の結果を得た。

第 1 章では、腸内細菌叢は、複合抗生剤 (ABT) 投与によりその優勢菌が Firmicutes から Bacteroidetes へ逆転し、細菌叢の多様性が約 30%減少することを示した。その変化は、脾細胞の Con A に対するサイトカイン応答性を低下させることを明らかにした。

第 2 章では、*Lactobacillus* 菌株の違いによる免疫応答性を比較検討した。その中で ABT 処置したマウスに *Lactobacillus plantarum* Lp1 株を経口投与すると、脾細胞の Con A 刺激下における IFN- $\gamma$  と IL-10 発現が有意に増加した。また、その現象は菌株特異的な現象であった。本結果は、機能性乳酸菌 (Lp1) 投与が脾細胞のサイトカイン発現に影響を与えることを明らかにした。

第 3 章では、腸内細菌叢の構成変化と炎症応答への影響を検討した。OVA 誘導性肺炎モデルにおいて、ABT 処置は、炎症を悪化させたが Lp1 投与により炎症緩和が確認された。その炎症制御には、IL-6、IL-13、ならびに IL-17 発現制御と IL-10 発現増加が関与した。以上の知見から Lp1 株は、経口投与により炎症性サイトカイン発現制御を伴う免疫調節機能を有することが示された。

本研究により、ABT 投与は腸内細菌叢の構成を変化させ、宿主免疫応答に影響を与えることが明らかになった。また、腸内細菌叢の構成変化は、炎症を悪化させる可能性があり、それを改善する乳酸菌として *Lactobacillus plantarum* Lp1 株の投与が効果的であることが示された。抗炎症作用は、Lp1 菌株特異的な

作用であり、今後のプロバイオティクスの臨床応用の可能性が期待され、作用成分を明らかにすることでさらに詳細な機能解析や応用に発展することが期待される。

## 謝辞

本稿を終えるに当たり、終始親身にご指導くださり、適切な助言を賜りました本学獣医学研究科獣医ウイルス学ユニット萩原克郎教授に心から感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり御協力いただいた本学獣医学研究科生産動物内科学Ⅰユニット田島誉士教授、獣医生化学ユニット岩野英知教授、獣医病理学ユニット岡本実准教授、神戸大学大学院 森ゆうこ特命准教授、大阪大学微生物病研究所 中村昇太特任准教授、また、獣医ウイルス学ユニット皆さまに心より感謝いたします。

## 引用文献

1. Akdis, M., Palomares, O., Van De Veen, W., Van Splunter, M. and Akdis, C. A. 2012. Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. J. Allergy Clin. Immunol. 129: 1438-1449.
2. Alcom, J., Crowe, C. and Kolls, J. 2010. Th17 cells in asthma and COPD. Annu. Rev. Physiol. 72: 495-516.
3. 有田 正光 2002. 2 地層環境と生物・化学的特性. 地圏の環境 1: 104-116.
4. Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Dimitrium, P. A., Thorson, L., Russell, S. and Yurist-D, S. 2015. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. Science Transl. Med. 30:7.
5. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Franandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pendersen, O., de Vos, W., Brunak, S., Dore, J., Consortium, M., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Bork, P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 473: 174-180.
6. Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V, Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M. and Honda, K. 2013. Treg

induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature 500: 232-236.

7. 辨野 義己 2015. VI. プロバイオティクスとその臨床的展望. 日本内科学会雑誌 104: 86-102.
8. Bisgaard, H., Li, N., Bonnelykke, K., Chawes, B. L. K., Skov, T., Paludan-Müller, G., Stokholm, J., Smith, B. and Krogfelt, K. A. 2011. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. J. Allergy Clin. Immunol. 128: 646-652.
9. Björkstén, B., Sepp, E. and Julge, K. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J. Allergy Clin. Immunol. 108: 516-520.
10. Diesner, S. C., Bergmayr, C., Pfitzner, B., Assmann, V., Krishnamurthy, D., Starkl, P., Endesfelder, D., Rothballer, M., Welzl, G., Rattei, T., Eiwegger, T., Szépfalusi, Z., Fehrenbach, H., Jensen-Jarolim, E., Hartmann, A., Pali-Schöll, I. and Untersmayr, E. 2016. A distinct microbiota composition is associated with protection from food allergy in an oral mouse immunization model. Clin. Immunol. 173: 10-18.
11. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. and Relman, D. A. 2006. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 308: 1635-1638.
12. Ekmekci, I., von Klitzing, E., Fiebiger, U., Neumann, C., Bacher, P., Scheffold, A., Bereswill, S. and Heimesaat, M. M. 2017. The probiotic compound VSL#3 modulates mucosal, peripheral, and systemic immunity

- following murine broad-spectrum antibiotic treatment. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7: 1-19.
13. Filippo, C. De, Cavalieri, D., M., Ramazzotti, M. and Baptiste, J. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 14691-14696.
  14. Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N. and Pace, N. R. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 13780-13785.
  15. Fujita, S., Yamashita, N., Ishii, Y., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Fukaya, T., Nozawa, R., Takamoto, Y., Yamashita, N., Taniguchi, M. and Sato, K. 2008. Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model. J. Allergy Clin. Immunol. 121: 95-104.
  16. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. appl. Bacteriol. 66: 365-378.
  17. Fung, H., Elina, T., Heikki, A. and Seppo, S. 2000. Modulation of humoral immune response though probiotic intake. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29: 47-52.
  18. Greenfeder, S., Umland, S. P., Cuss, F. M., Chapman, R. W. and Egan, R. W. 2001. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respir. Res. 2: 71-79.
  19. Haller, D. 2008. Molecular Interactions of Commensal Enteric Bacteria

- with the Intestinal Epithelium and the Mucosal Immune System. Bioscience 27: 37-48.
20. Hoskin-Parr, L., Teyhan, A., Blocker, A. and Henderson, A. J. W. 2013. Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7.5 yr: A dose-dependent relationship. Pediatr. Allergy Immunol. 24: 762-771.
  21. Hougee, S., Vriesema, A. J. M., Wijering, S. C., Knippels, L. M. J., Folkerts, G., Nijkamp, F. P., Knol, J. and Garssen, J. 2010. Oral treatment with probiotics reduces allergic symptoms in ovalbumin-sensitized mice: A bacterial strain comparative study. Int. Arch. Allergy Immunol. 151: 107-117.
  22. Hua, X., Goedert, J. J., Pu, A., Yu, G. and Shi, J. 2016. Allergy associations with the adult fecal microbiota: Analysis of the American Gut Project. EBioMedicine. 3: 172-179.
  23. Ichikawa, S., Miyake, M., Fujii, R. and Konishi, Y. 2009. Orally administered lactobacillus paracasei KW3110 induces in vivo IL-12 production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 1561-1565.
  24. Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H. and Murray, T. S. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 5354-5259.
  25. Imani Fooladi, A. A. and Kehoe, K. 2001. Infection of human B lymphocytes with MMR vaccine induces IgE class swiching. Clin. Immunol. 100: 355-361.

26. Imani Fooladi, A. A., Yazdi, M. H., Pourmand, M. R., Mirshafiey, A., Hassan, Z. M., Azizi, T., Mahdavi, M. and Soltan Dallal, M. M. 2015. Th1 cytokine production induced by *Lactobacillus acidophilus* in BALB/C mice bearing transplanted breast tumor. Jundishapur J. Microbiol. 8: 1-5.
27. Islam, K. B. M. S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T. and Yokota, A. 2011. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. Gastroenterology 141: 1773-1781.
28. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Littman, D. R., Li, C., Yang, C., Hather, G., Liu, R. and Zhao, H. 2010. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 139: 485-498.
29. Ju, H., Xing, W., Yang, J., Zheng, Y., Jia, X., Zhang, B., and Ren, H. 2016. An effective cytokine adjuvant vaccine induces autologous T-cell response against colon cancer in an animal model. BMC Immunol. 17: 31-41.
30. Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. and Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. Lancet 357: 1076-1079.
31. Lankelma, J. M., van Vught, L. A., Belzer, C., Schultz, M. J., van der Poll, T., de Vos, W. M. and Wiersinga, W. J. 2017. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal



- microbiota dysregulation: a pilot study. Intensive Care Med. 43: 59-68.
32. Leclercq, S., Mian, F. M., Stanisz, A. M., Bindels, L. B., Cambier, E., Ben-Amram, H., Koren, O., Forsythe, P. and Bienenstock, J. 2017. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. Nat. Commun. 8: 150-162.
  33. Lee, B., Geha, R. and Leung, D. 1988. Diseases, IgE response and its regulation in allergic diseases. Pediatr. Clin. North. Am. 35: 953-967.
  34. Lee, H. A., Kim, H., Lee, K. W. and Park, K. Y. 2015. Dead *Lactobacillus plantarum* stimulates and skews immune responses toward T helper 1 and 17 polarizations in RAW 264.7 cells and mouse splenocytes. J. Microbiol. Biotechnol. 26: 469-476.
  35. Lindsay, J. A., Moore, C. E., Day, N. P., Peacock, S. J., Witney, A. A., Stabler, R. A., Husain, S. E., Butcher, P. D. and Hinds, J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. J. Bacteriol. 188: 669-676.
  36. Mahowald, M. A., Rey, F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R. K., Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Crock, L. W., Russell, A., Verberkmoes, N. C., Hettich, R. L. and Gordon, J. I. 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 5859-

5864.

37. Meijerink, M., Wells, J. M., Taverne, N., De Zeeuw Brouwer, M. L., Hilhorst, B., Venema, K. and Van Bilsen, J. 2012. Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization model. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 65: 488-496.
38. Mitsuoka, T. 2014. Establishment of intestinal bacteriology. Biosci. microbiota, food Heal. 33: 99-116.
39. Mitsuoka, T. 2014. Development of functional foods. Biosci. microbiota, food Heal. 33: 117-128.
40. Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Pagé, N., Olivenstein, R., Elias, J. and Chakir, J. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. J. Allergy Clin. Immunol. 108: 430-438.
41. Moore, K., O' Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. and Mosmann, T. 1993. Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol. 11: 165-190.
42. Murphy, K. M. and Reiner, S. L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. Nat. Rev. Immunol. 2: 933-944.
43. Mutius, E., Braun-Fahrlander, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlermann, S., Maisch, S., Waser, M. and Nowak, D. 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. Clin. Exp. Allergy. 30: 1230-1234.
44. Nagata, Y., Yoshida, M., Kitazawa, H., Araki, E. and Gomyo, T. 2010. Improvements in seasonal allergic disease with *Lactobacillus plantarum* No. 14. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 1869-1877.

45. Nishijima, S., Suda, W., Oshima, K., Kim, S. W., Hirose, Y., Morita, H. and Hattori, M. 2016. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. DNA Res. 23: 125-133.
46. Noguchi, S., Hattori, M., Sugiyama, H., Hanaoka, A., Okada, S. and Yoshida, T. 2012. *Lactobacillus plantarum* NRIC1832 Enhances IL-10 Production from CD4 + T Cells in Vitro. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76: 1925-1931.
47. 大野 博 2014. 常在細菌叢が操るヒトの健康と疾病. 実験医学増刊 32: 3-6.
48. Olsen, G. J., Woese, C. R. and Overbeek, R. 1994. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. J. Bacteriol. 176: 1-6.
49. 長田 裕子, 上村 佑也, 坂 智秀, 吉田 睦子, 西塔 正孝, 工藤 秀機, 國崎 直道, 五月 紀春 2008. *Lactobacillus plantarum* No.14 株の抗アレルギー効果. 日本食品化学工学会誌 55:43-49.
50. Oyama, N., Sudo, N., Sogawa, H. and Kubo, C. 2001. Antibiotic use during infancy promotes a shift in the Th1/Th2 balance toward TH2-dominant immunity in mice. J. Allergy Clin. Immunol. 107: 153-159.
51. Pawankar, R., Canonica, G., Holgate, S. and Lockey, R. 2012. Allergic diseases and asthma: a major global health concern. Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol. 12: 39-41 .
52. Penders, J., Stobberingh, E. E., Brandt, P. A. V. D. and Thijs, C. 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. 62: 1223-1236.

53. Prescott, P. and Bakowski, M. T. 1999. Pathogenesis of fibrosing colonopathy: the role of methacrylic acid copolymer. Pharmacoepidemiol. Drug Saf. 8: 377-384.
54. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J., Hansen, T., Paslier, D. Le, Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N. and Yang, H. 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. Nature 464: 59-65.
55. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takebayashi, K. and Raz, E. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology 126: 520-528.
56. Romagnani, S. 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. Curr. Opin. Immunol. 6: 838-846.
57. Russell, S. L., Gold, M. J., Hartmann, M., Willing, B. P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M.-R., Mohn, W. W., McNagny, K. M. and Finlay, B. B. 2012. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. EMBO Rep. 13: 440-447.
58. Rutten, N. B. M. M., Gorissen, D. M. W., Eck, A., Niers, L. E. M., Vlieger,

- A. M., Besseling-Van Der Vaart, I., Budding, A. E., Savelkoul, P. H. M., Van Der Ent, C. K. and Rijkers, G. T. 2015. Long term development of gut microbiota composition in atopic children: Impact of probiotics. PLoS One. 10: 1-17.
59. Sakai, F., Hosoya, T., Ono-Ohmachi, A., Ukibe, K., Ogawa, A., Moriya, T., Kadooka, Y., Shiozaki, T., Nakagawa, H., Nakayama, Y. and Miyazaki, T. 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- $\beta$  expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. PLoS One. 9:8 e105370.
60. Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Colins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E. and Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics. Int. J. food Microbiol. 44: 93-106.
61. Schiavi, E., Barletta, B., Butteroni, C., Corinti, S., Boirivant, M. and Di Felice, G. 2011. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. 66: 499-508.
62. Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M. and Nanno, M. 2009. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. Immunology 128: 858-869.
63. Smelt, M. J., de Haan, B. J., Bron, P. A., van Swam, I., Meijerink, M., Wells, J. M., Faas, M. M. and de Vos, P. 2013. Probiotics Can

- Generate FoxP3 T-Cell Responses in the Small Intestine and Simultaneously Inducing CD4 and CD8 T Cell Activation in the Large Intestine. PLoS One. 8: e68952.
64. Soltan Dallal, M. M., Yazdi, M. H., Holakuyee, M., Hassan, Z. M., Abolhassani, M. and Mahdavi, M. 2011. Lactobacillus casei ssp . casei induced Th1 cytokine profile and natural killer cells activity in invasive ductal carcinoma bearing mice. J. Allergy Asthma Immunol. 11: 1-7.
  65. Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K. and Mazmanian, S. K. 2014. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111: 13145-13150.
  66. Stensballe, L., PhD, J., MSc, S., PhD, K. and DMSc, H. 2013. Use of Antibiotics during Pregnancy Increases the Risk of Asthma in Early Childhood. J. Pediatr. 162: 832-838.
  67. Thompson, J. A., Oliveira, R. A., Djukovic, A., Ubeda, C. and Xavier, K. B. 2015. Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. Cell Rep. 10: 1861-1871.
  68. Thorburn, A. N., McKenzie, C. I., Shen, S., Stanley, D., Macia, L., Mason, L. J., Roberts, L. K., Wong, C. H. Y., Shim, R., Robert, R., Chevalier, N., Tan, J. K., Mariño, E., Moore, R. J., Wong, L., McConville, M. J., Tull, D. L., Wood, L. G., Murphy, V. E., Mattes, J., Gibson, P. G. and Mackay, C. R. 2015. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. Nat. Commun. 6: 7320.

69. 辻 典子 2016. 腸内微生物の核酸による抗炎症メカニズム. 腸内細菌学雑誌 30: 85.
70. Turnbaugh, P. J., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. and Gordon, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444: 1027-1031.
71. Watanabe, J., Fujiwara, R., Sasajima, N., Ito, S. and Sonoyama, K. 2010. Administration of antibiotics during infancy promoted the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 358-363.
72. Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y. and Kumemura, M. 2003. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 111: 587-591.
73. Wilck, N., Matus, M. G., Kearney, S. M., Olesen, S. W., Forslund, K., Bartolomeus, H., Haase, S., Mahler, A., Balogh, A., Marko, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F. H., Tsvetkov, D., Klug, L., Costea, P. I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, V., Schatz, V., Neubert, P., Fratzter, C., Kratzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Boschmann, M., Dechend, R., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Bork, P., Linker, R. A., Alm, E. J. and Muller, D. 2017. Salt-responsive gut commensal modulates Th17 axis and disease. Nature. 7682: 585-589.
74. Yamamoto-Hanada, K., Yang, L., Narita, M., Saito, H. and Ohya, Y. 2017. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5. Ann. Allergy, Asthma Immunol. 119: 54-58 .

75. Yatunennko, T., Ray, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C. and Gordon, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 486: 222-227.
76. Yoshida, A., Yamada, K., Yamazaki, Y., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M. and Totsuka, M. 2011. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells through a MyD88-dependent signalling pathway. Immunology 133: 442-451.
77. Zhang, Z., Shi, L., Pang, W., Liu, W., Li, J., Wang, H. and Shi, G. 2016. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model. PLoS One. 11: 1-16.